

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I – Großhadern  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Gerhard Steinbeck

**Die endogene Zirkulation von CD34<sup>+</sup>-Stammzellen bei der  
postmyokarditischen dilatativen Kardiomyopathie ausgelöst durch den  
Coxsackievirus B3 im Mausmodell**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
**Monika Gatti, geb. Leiß**

aus  
**München**

im Jahr  
**2011**

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. W.- M. Franz
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Udo Kummer Priv. Doz. Dr. Corinna Lebherz
Mitbetreuung durch die promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. med. H. D. Theiss Dr. med. S. M. Brunner
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	07.07.2011

*Meiner Familie*

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	7
1.1 Bedeutung der kardiovaskulären Erkrankungen und Epidemiologie der DCM.....	7
1.2 Pathophysiologie der DCM und DCMi.....	8
Tabelle 1: histologischer Befund bei DCMi modifiziert nach Herold [15].....	9
1.3 Verlauf der DCMi am Beispiel des Coxsackievirus B3.....	10
1.4 Adulte Stammzellen.....	12
1.4.1 Bedeutung der Stammzelltherapie.....	13
1.4.2 Die endogene Zirkulation der CD34+-Stammzellen.....	15
1.4.3 Technische Applikationsmöglichkeiten adulter Stammzellen.....	18
1.4.4 Stammzellmobilisation mittels G-CSF .....	19
1.4.5 Klinische Studien mit G-CSF bei der ischämischen und der dilatativen Kardiomyopathie .....	21
1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....	25
1.6 Versuchsaufbau.....	26
1.6.1 Verifizierung der DCM und Analyse der zirkulierenden endogenen CD34+-Stammzellpopulationen.....	26
1.6.2 Veränderungen der endogenen Stammzellzirkulation nach G-CSF-Applikation und deren Auswirkungen auf die kardiale Funktion .....	27
2. Material und Methoden.....	28
2.1 Materialien.....	28
2.1.1 Allgemeine Chemikalien und Lösungsmittel.....	28
2.1.2 allgemeines Operationszubehör.....	29
2.1.3 Laborgeräte und sonstige Materialien.....	29
2.1.4 Pharmaka.....	31
2.1.5 Herzkatheter-Zubehör.....	31
2.1.6 Materialien für das MRT.....	32
2.1.7 spezifisches Zubehör für die FACS-Analyse.....	32
2.1.8 Histologie und Immunhistologie.....	33
2.1.9 Materialien für die Real Time PCR.....	34
2.1.10 Zubehör für das ELISA-Verfahren.....	36
2.1.11 Versuchstiere.....	36
2.2. Methoden.....	37
2.2.1 Versuchstiere.....	37
2.2.1.1 Haltung der Mäuse.....	37
2.2.1.2 Ausbildung einer akuten Myokarditis.....	38
2.2.1.2.1 Coxsackievirus B3 .....	38
2.2.1.2.1 Die akute Infektion.....	38
2.2.2. Hämodynamische Messungen.....	39
2.2.2.1. Herzkatheter.....	39
2.2.2.1.1 Grundprinzip des Katheterversfahrens.....	39
2.2.2.1.2 Ablauf der Messung .....	41
2.2.2.1.3 Auswertung .....	42
2.2.2.2 Magnetresonanztomographie (MRT).....	42
2.2.2.2.1 Grundprinzip .....	43

2.2.2.2.2 Ablauf der Messung.....	45
2.2.2.2.3 Auswertung.....	46
2.2.3. Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS).....	47
2.2.3.1. Grundprinzip und Messung der Proben.....	47
2.2.3.2. Materialgewinnung und -aufbereitung.....	49
2.2.3.2.1 Blutentnahme und Knochenmarkgewinnung.....	49
2.2.3.2.2 Aufbereitung der Materialien .....	49
2.2.3.2.3 Probenherstellung für das kardiale FACS.....	51
2.2.4. Histologie und Immunhistologie.....	53
2.2.4.1 Histopathologie mittels HE- und Trichromfärbung.....	54
2.2.4.2 Immunhistochemie.....	55
2.2.4.2.1 VCAM-1.....	57
2.2.4.2.2 Caspase-3.....	57
2.2.5. Real-Time-PCR.....	57
2.2.5.1. Gewinnung der cDNA.....	58
2.2.5.2. Grundprinzip und Durchführung der Real Time PCR.....	59
2.2.6 Enzyme-linked immuno sorbent assay (= ELISA).....	62
2.2.6.1 Grundprinzip des ELISA.....	62
2.2.6.2 Probenaufbereitung und Auswertung .....	63
2.2.7 Statistische Auswertung.....	63
3. Ergebnisse.....	64
3.1 Verifizierung der postinfektiösen dilatativen Kardiomyopathie.....	64
3.1.1 Der Hämodynamik.....	64
3.1.2 Histologie.....	67
3.2 Analyse von Zirkulation und Homing der Knochenmarksstammzellen .....	70
3.2.1 Screening mittels Real-Time PCR.....	70
3.2.2 Bestätigung mittels ELISA-Verfahren.....	71
3.2.3 Immunhistochemie.....	71
3.2.4 Peripheres Blut und Knochenmark.....	72
3.2.5 Myokardiales Homing von Knochenmarksstammzellen.....	74
3.3 Einfluss von G-CSF .....	76
3.3.1. Veränderungen der endogenen Stammzellen.....	77
3.3.1.1 Verbessertes myokardiales Homing.....	77
3.3.1.2 erhöhtes Auftreten von residenten kardialen Stammzellen.....	78
3.3.2 Veränderungen in der Histologie.....	78
3.3.2.1 Histopathologischer Befund.....	78
3.3.2.2 Einfluss auf die Apoptose.....	79
3.3.3 Verbesserung der Herzfunktion nach G-CSF im MRT.....	80
4. Diskussion.....	83
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	83
4.2 Die Infektion mit dem Coxsackievirus B3 führt zur dilatativen Kardiomyopathie im Mausmodell .....	84
4.3 Erhöhtes Homing der CD34+-Subpopulationen über die VCAM-1/VLA-4-Achse im murinen Modell der postmyokarditischen Kardiomyopathie.....	85
4.4 VCMA-1/VLA-4 Achse als mögliches therapeutisches Ziel.....	88
4.5 Der VCAM-1/VLA-4 Reparaturmechanismus wird durch gesteigerte Stammzellmobilisation gestärkt.....	89
4.6 Die kardiale Funktion steigt durch die von G-CSF vermittelten Effekte bei	

postmyokarditischer DCM.....	91
5. Zusammenfassung.....	92
6. Literaturverzeichnis.....	93
7. Abkürzungsverzeichnis.....	106
8. Danksagung.....	109
9. Lebenslauf.....	110

# **1. Einleitung**

## **1.1 Bedeutung der kardiovaskulären Erkrankungen und Epidemiologie der DCM**

Insgesamt verstarben im Jahr 2008 in Deutschland 844.439 Menschen, den größten Anteil der Todesfälle mit 43,1% (= 363.785 Personen) bildeten wie in den Jahren zuvor die Herz-/ Kreislauferkrankungen [10-11]. Auch bei den weiterhin steigenden Gesamtgesundheitskosten pro Person (3100€/Jahr) sind die Herz-/ Kreislauferkrankungen mit dem höchsten Kostenanteil (450€/Person) in Deutschland führend [12].

Weiterhin ist in der Bundesrepublik zur Zeit der häufigste Grund für einen stationären Krankenhausaufenthalt die Herzinsuffizienz [13]. Bereits im Jahr 2006 war die Herzinsuffizienz erstmals mit 317.000 Fällen die am meisten angegebene Hauptdiagnose für einen stationären Krankenhausaufenthalt und die angefallenen Kosten beliefen sich auf und 2,9 Milliarden Euro [14].

Auch die Kardiomyopathien führen in ihrem Terminalstadium zu einer Herzinsuffizienz und unter den verschiedenen Formen der Herzmuskelerkrankungen stellt die dilatative Kardiomyopathie (= DCM) mit einer Inzidenz von 6/ 100.000/ Jahr und einer Prävalenz von 36/100000 Einwohner die häufigste Form dar [15]. Die Prognose der DCM hängt vor allem von der linksventrikulären Funktion zum Zeitpunkt der Diagnosestellung ab. So schwankt der Überlebenszeitraum zwischen einer 80%igen 5-Jahres-Überlebensrate bei asymptomatischer Verlaufsform bis zu einer 50%-igen (35-62%) 2-Jahres-Überlebensrate bei hochgradiger Funktionseinschränkung [16]. Eine Verbesserung im Überleben wird vor allem durch eine intensive Herzinsuffizienzbehandlung erreicht. Neben Allgemeinmaßnahmen wie Ausdauertraining, Verzicht auf kardiotoxische Substanzen, zum Beispiel Alkohol, und eine gute Einstellung von Risikofaktoren (Hypertonie u.a.) ist die medikamentöse Therapie die tragende Säule. Diese entspricht der Stufentherapie bei Herzinsuffizienz und umfasst ACE-Hemmer, AT-Rezeptorantagonisten,  $\beta$ -Blocker, Diuretika, Spironolacton und Digitalis [16].

Bis heute ist als einzige kausale Therapie der DCM die Herztransplantation bekannt. Im Jahr 2009 wurden in Deutschland 363 Herztransplantationen durchgeführt bei insgesamt 727 Neuanmeldungen. Bei mehr als der Hälfte (404/727 Patienten) dieser Neuanmeldungen war die

## 1. Einleitung

Indikation zur Listung (nach ICD-10 Schlüssel) eine dilatative Kardiomyopathie [17].

### **1.2 Pathophysiologie der DCM und DCMi**

Ursprünglich wurden die Kardiomyopathien (CM) als Erkrankungen des Herzmuskels ohne bekannte Ursache angesehen. Abgegrenzt wurden sie von den spezifischen Ursachen [18]. Aufgrund der Weiterentwicklungen immunhistochemischer und molekularbiologischer Nachweisverfahren von Myokardbiopsien wuchs das Verständnis für die Ätiologie und der Pathogenese der einzelnen Myopathieformen. 1995 war es der WHO/ISFC möglich, eine erweiterte Klassifikation zu veröffentlichen [19]:

Kardiomyopathien wurden nun definiert als Erkrankungen des Myokards, die mit kardialer Dysfunktion einhergehen. Unterteilt wurden sie zum einem nach der hauptsächlichen Pathophysiologie in folgenden Gruppen: dilatative, hypertrophische, restriktive, arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie. Daneben besteht auch immer noch die Gruppe der unklassifizierbaren Kardiomyopathien. Die für diese Arbeit wichtig Gruppe der dilatativen Kardiomyopathie wurde wie folgt beschrieben: Die DCM ist charakterisiert durch die Dilatation des linken oder beider Ventrikel bei gleichzeitig eingeschränkter Pumpfunktion. Ursächlich hierfür können unter anderem idiopathische, familiäre/genetische, virale/immunogene oder toxische Gründe sein. Aufgrund der vielfältigen ursächlichen Pathomechanismen ist das histologische Bild der DCM nicht spezifisch. Klinisch bedeutsam ist die häufig Progression der Erkrankung und deren gefährlichen Komplikation wie Arrhythmien, Thromboembolien und vor allem der plötzliche Herztod, die jederzeit im Krankheitsverlauf auftreten können.

Zum anderen wurde der Begriff spezifische Kardiomyopathien ab diesem Zeitpunkt dazu benützt, Herzmuskelerkrankungen zu beschreiben, die mit spezifischen kardialen oder systemischen Dysfunktionen vergesellschaftet waren. Diese umfassen unter anderem ischämische, valvuläre, hypertensive, toxische und inflammatorische Ursachen [19].

Die Definition der inflammatorischen Kardiomyopathie ist sehr weit gefasst: so werden innerhalb dieser Gruppe nochmals idiopathische, autoimmune und infektiöse Ursachen beschrieben. Gemeinsam ist ihnen aber, dass eine chronische Myokarditis/entzündliche dilatative CM als



## 1. Einleitung

gesichert gilt, wenn im Biopsat  $\geq 14$  Lymphozyten (inklusive Makrophagen)/mm<sup>3</sup> gezählt werden können oder ein Nachweis von viraler RNA oder DNA gelingt [15]/[26]. Einen genaueren Überblick über die histologische und immunhistologische Einteilung bietet Tabelle 1:

<b>Diagnose</b>	<b>Konventionelle Histologie</b>	<b>Immunhistologie</b>
1. Akute Myokarditis	Infiltrat, Ödem und Myozytolyse	Infiltration mit monoklonalen Antikörpern, Immunglobulin- und Komplementfixation
2. Andauernde Myokarditis	Wie unter 1.	Entspricht 1.
3. Abheilende Myokarditis	Rückläufiges Infiltrat und reparative Fibrose, fakultativ: Myozytolyse	Entspricht 1.
4. Borderline Myokarditis	Vereinzelte Lymphozyten ohne Myozytolyse	1-13 Lymphozyten/mm <sup>3</sup>
1. Chronische Myokarditis/ DCMi	Nicht definiert	$\geq 14$ Lymphozyten/mm <sup>3</sup> fakultativ: Nachweis von viraler RNA oder DNA

*Tabelle 1: histologischer Befund bei DCMi modifiziert nach Herold [15]*

Aufgrund der in Tabelle 1 aufgezeigten diagnostischen Verfeinerung konnte in vielen Arbeiten nachgewiesen werden, dass ein höherer Anteil der DCM als vermutet durch virale Infektionen bedingt ist. Bereits 1970 zeigten Stevens et al. [20] die Bedeutung der viralen Myokarditis. Diese Vermutungen wurden erneut bestätigt durch Maron et al. [21], welche zwischen 1980-2006 über 1800 Fälle des plötzlichen Herztodes in den USA untersuchten und feststellten, dass der Anteil der viral bedingten unerkannten Myokarditis bei 6% liegt. Auch Mason et al. [22] und Kuhl et al. [23] erörtern in ihren Arbeiten die Bedeutung der viralen und postviralen Immunprozesse als Hauptursache für eine chronische Myokarditis und deren Spätfolge DCM.

Schon 1986 konnten Bowels et al. [24] mit Hilfe von RNA-Isolierungen nachweisen, dass 50% aller infektiösen Fälle viral ausgelöst werden. Über die Jahre konnte nachgewiesen werden, dass in dieser Studie wohl eine Kreuzreaktion mit uninfiziertem kardialen Gewebe stattgefunden hatte [25]. Nichtsdestotrotz zeigt diese Studie die Bedeutung von Viren in der Entstehung der inflammatorischen dilatativen Kardiomyopathie (= DCMi).

Besonders hervorzuheben ist vor allem die Gruppe der Enteroviren mit dem Vertreter

## 1. Einleitung

Coxsackievirus B3. Dieser kardiotope Virus kann bei durchschnittlich 25% der Patienten mit chronischer Myokarditis/dilatativer CM mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden im Herzmuskelgewebe nachgewiesen werden [26]. Weitere Erreger sind der Parvovirus B19, Adeno-, Influenza-, Echo-, Cytomegalie-, Epstein-Barr-, Hepatitis C-, das HI- und das humane Herpesvirus 6. Auch einige Bakterien, so zum Beispiel Staphylo- und Streptokokken, und auch Parasiten können die DCMi auslösen [15].

### **1.3 Verlauf der DCMi am Beispiel des Coxsackievirus B3**

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Bild der spezifischen Form der inflammatorischen Kardiomyopathie (= DCMi) ausgelöst durch das Coxsackievirus B3 (CVB3).

Der Coxsackievirus gehört zur Familie der Picornaviren und ist einer der häufigsten Gründe, die zu einer Myokarditis [27]/[26] führen. Er kann im Myokard persistieren (siehe 1.2) und eine DCM ausbilden [28]. Es gibt, pathophysiologisch betrachtet, drei verschiedene Wege, die die akute Myokarditis im Verlauf nehmen kann [29]:

1. Der Virus selbst persistiert und führt zur viruspositiven DCM.
2. Der Virus selbst kann vom Körper abgewehrt werden. Allerdings sind Autoimmunprozesse in Gang gesetzt worden, die zu einer virusnegativen DCM führen
3. Die Myokarditis heilt aus, ohne dass der Virus eliminiert werden kann und somit weiterhin im Gewebe nachweisbar ist.

Der Mensch nimmt den Virus zumeist über den Mund auf. Im Körper kommt es initial zu einer Vermehrung im Intestinaltrakt und anschließender Ausscheidung der Viren. Auf diesem Weg gelangen die Viren in das Herz und beginnen erneut sich intrazellulär zu replizieren. In diesem Abschnitt wirken die Viren selbst lytisch auf die Myozyten und schädigen das Herz direkt [26]. Nach einer unterschiedlich langen Inkubationszeit (meist 6-12 Tage) treten die ersten Symptome auf, welche die meisten Betroffenen im Zusammenhang mit einer Erkältung sehen oder sogar nur als solche wahrnehmen. Klinisch kann dieses Bild durchaus sehr unterschiedlich ausfallen: das Spektrum reicht von asymptomatisch über subklinisch bis zu einem fulminanten Verlauf mit akuter Herzinsuffizienz. Die Patienten fühlen sich geschwächt und müde und im zugehörigen EKG kann

## 1. Einleitung

man oft eine Sinustachykardie, Rhythmusstörungen und sogar Zeichen eines (in-)kompletten Wandschadens finden [15].

Durch die Entzündungsprozesse kommt es im Herzen zu pathologischen Umbauprozessen. Im Myokard finden sich neben den Entzündungszellen auch fibrotische Areale. Der Herzmuskel kann in Folge immer stärker ausdünnen und endet letztendlich in einer Erweiterung des linken oder beider Ventrikeln und imponiert somit zumeist in der dilatativen Form [30]/[15]. Äußerlich zeigt sich eine Kardiomegalie und die veränderten Kammern können die normale Herzfunktion nicht mehr aufrecht erhalten. Dies äußert sich vor allem in einer messbar eingeschränkten Ejektionsfraktion. Klinisch bemerkbar wird diese systolische Pumpfunktionsstörung zunächst durch anhaltende Leistungsschwäche, Belastungsdyspnoe und peripheren Ödemen und schreitet bis zur terminalen Herzinsuffizienz voran. Komplikationen sind ventrikuläre Tachykardien, arterielle und pulmonale Embolien und der plötzliche Herztod.

Meistens werden die Patienten, die an einer virusinduzierten Myokarditis leiden, zu spät diagnostiziert, so dass therapeutische Optionen wie die antiphlogistische Behandlung nicht mehr anwendbar sind [31]. Auch die Versuche, in einer späteren Phase antientzündlich und immunmodulatorisch zu therapieren, waren nicht in allen Fällen überzeugend. Eine wichtige Grundlage, die über Erfolg oder Misserfolg entschied, war die Gewebeuntersuchung auf zwei Faktoren: 1. die intramyokardiale Inflammation und 2. die Viruspersistenz. So zeigten zwar Kuhl et al. [32] bereits 1995, dass Kortikosteroide eine Möglichkeit bieten, die DCM zu behandeln, aber neuere Studien belegten, dass bei Viruspersistenz im Biopsat dieses Behandlungsschema zu einer deutlichen Verschlechterung führte [33]/[34]. Im Jahr 2003 stellten Kuhl et al. [35] die Möglichkeit dar, eine DCMi mit Viruspersistenz anhand von Interferon-beta zu behandeln. Sie zeigten, dass die immunmodulatorische Therapie bei bestimmten Viren, zum Beispiel dem Parvovirus B19, den Erreger eliminieren kann und sich dadurch die linksventrikuläre Funktion verbessert.

Aber trotz all dieser Versuche und Studien ist zum heutigen Zeitpunkt die Unterstützung der linksventrikulären Funktion weiterhin die bestmögliche Therapie [31], die aber ein Voranschreiten der Herzmuskelschädigung nicht verhindern kann und eine Herztransplantation erforderlich macht [36]. Nach wie vor herrscht ein großer Mangel an Spenderorganen (siehe auch Kapitel 1.1) und darum ist es um so bedeutsamer, die zugrunde liegenden Mechanismen noch besser zu verstehen und neue Möglichkeiten in der Therapie der dilatativen Kardiomyopathie zu finden, wie zum Beispiel die Stammzelltherapie.

### **1.4 Adulte Stammzellen**

Adulte Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die die Möglichkeit haben, sich in verschiedene Gewebe weiterzuentwickeln. Als großen Nachteil in der Therapie mit körpereigenen Stammzellen sieht man an, dass sie nur noch ein eingeschränktes Differenzierungspotential besitzen. Der Vorteil adulter Stammzellen liegt neben der ethnischen Unbedenklichkeit auch in der einfachen Gewinnung, der fehlenden Malignität und der, aufgrund ihrer autologen Herkunft, nicht stattfindenden Abstoßungsreaktion [37].

Adulte Stammzellen finden sich im menschlichen Körper in den unterschiedlichsten Organen: neben dem Knochenmark und Blut auch in Muskel- und Fettgewebe oder in der Nabelschnur. Ihr größtes Reservoir stellt beim Menschen das Knochenmark dar. Die Stammzellen bestehen aus verschiedenen Untergruppen, welche unterschiedliche Weiterentwicklungsmöglichkeiten haben und anhand ihrer Oberflächenmoleküle differenziert werden können. Über die Gruppen und Merkmale informiert Tabelle 2.

## 1. Einleitung

Subtyp	Quelle	Charakteristika	Literatur
Hämatopoetische Stammzellen (HSC)	KM	Human: CD34 <sup>+</sup> , CD45 <sup>+</sup> , CD133 <sup>+</sup> , c-kit <sup>+</sup> , Lin <sup>-</sup> murine: Lin <sup>-</sup> , Sca-1 <sup>+</sup> , c-kit <sup>+</sup>	[38]/[39]
Endotheliale Progenitorzellen (EPC)	PB	Isolation aus mononukleären Zellen CD31 <sup>+</sup> , CD34 <sup>+</sup> , CD133 <sup>+</sup> , CD105 <sup>+</sup> , CD45 <sup>-</sup> , KDR <sup>+</sup> , Tie-2 <sup>+</sup>	[40-41]
Side population	KM	Ausschleusen des Farbstoffes Hoechst 33342 über den Transportkanal ABCG2	[42-43]
Mesenchymale Stammzellen (MSC)	KM	Gebunden an Fibronectin, nicht hämatopoetische Knochenmarksstammzellen CD34 <sup>-</sup> , CD45 <sup>-</sup> , CD133 <sup>-</sup> , CD44 <sup>+</sup> , CD90 <sup>+</sup> , CD105 <sup>+</sup>	[44-45]
Multipotente adulte Progenitorzelle (MAPC)	KM	Subtyp von MSC; können sich noch in alle 3 Zelllinien differenzieren	[46]
Umbilikale somatische Stammzellen (USSC)	Nabelschnur	Subtyp von MSC; können sich noch in alle 3 Zelllinien differenzieren	[47]
Very small embryonic like stem cells (VCELSC)	KM	CXCR4 <sup>+</sup> /SCA-1 <sup>+</sup> /lin <sup>-</sup> /CD45 <sup>-</sup> Oct4 <sup>+</sup> , Nanog <sup>+</sup>	[48]/[49]
Residente kardiale Stammzellen (CSC)	Herz	c-Kit <sup>+</sup> /-, Sca-1 <sup>+</sup> , MDR1 <sup>+</sup> , KDR1 <sup>+</sup> ; aus neonatalen Herzen auch Isl-1 <sup>+</sup>	[50]/[51]/[52]
Skelettmyoblasten (SM)	Skelettmuskel	Isolation aus Skelettmuskelproben ex vivo-Kultivierung CD56 <sup>+</sup>	[53]

*Tabelle 2: Überblick über die verschiedenen Stammzellsubpopulationen modifiziert nach Engelmann [1] und Brunner [54]*

### 1.4.1 Bedeutung der Stammzelltherapie

Das Herz selbst ist, wie unter 1.2 beschrieben, nicht in der Lage, den Prozess des pathologischen „Remodellings“ aufzuhalten und die regenerative Medizin versucht mit Hilfe von Stammzellen daher Einfluss auf diese Vorgänge zunehmen. Schon länger ist bekannt, dass bei der ischämischen Kardiomyopathie (= ICM), meist in Folge eines Myokardinfarktes, die Mobilisation und das Homing von adulten Stammzellen (siehe 1.4.2) aus dem Knochenmark eine große Rolle spielt. Die CD34<sup>+</sup>-Populationen fördern im Herzen vorwiegend über parakrine Mechanismen die Gefäßneubildung, verhindern die Apoptose und unterstützen dadurch die Reparaturvorgänge [55]/

## 1. Einleitung

[56]/[57]/[58].

Vermutlich werden diese positiven Effekte durch Zytokine, die von den Knochenmarksstammzellen (=BMC) sezerniert werden, weiter unterstützt. So schütten die BMCs unter ischämischen Bedingungen die Faktoren VEGF, FGF (= fibroblast growth factor), IGF-1 (= Insulin-like-Growth-Factor) und SDF-1 aus [59]. Mesenchymale Stammzellen können Akt-1 und Sfrp2 (= secreted frizzled related protein 2) sezernieren, die ebenfalls kardioprotektiv wirken können [60-61].

Im Gegensatz zu Orlic et al. geht man heute davon aus, dass sich die Knochenmarksstammzellen nur zu einem sehr geringen Teil in Kardiomyozyten transdifferenzieren [62]. Auch verschiedene andere Projekte zeigten die Weiterentwicklung eines kleinen Prozentsatzes von Stammzellen zu Kardiomyozyten, Endothel- und glatten Muskelzellen [63]/[64]/[65]. Mit diesen Befunden einhergehend schien sich die Herzleistung zu bessern. Wahrscheinlicher ist die Theorie von Murry et al. [66] und Agbulut [67]. Sie stellten zwar nach Applikation von markierten hämatopoetischen Vorläuferzellen auch eine gesteigerte kardiale Funktion fest, konnten aber keine Stammzellen im Herzen selbst nachweisen. Sie führten die positive Wirkung auf eine verminderte Apoptose der Myozyten und einem geringeren kardialen Remodelling zurück.

Einen Überblick über die verschiedenen Mechanismen der Stammzellen gibt die Abbildung 1:

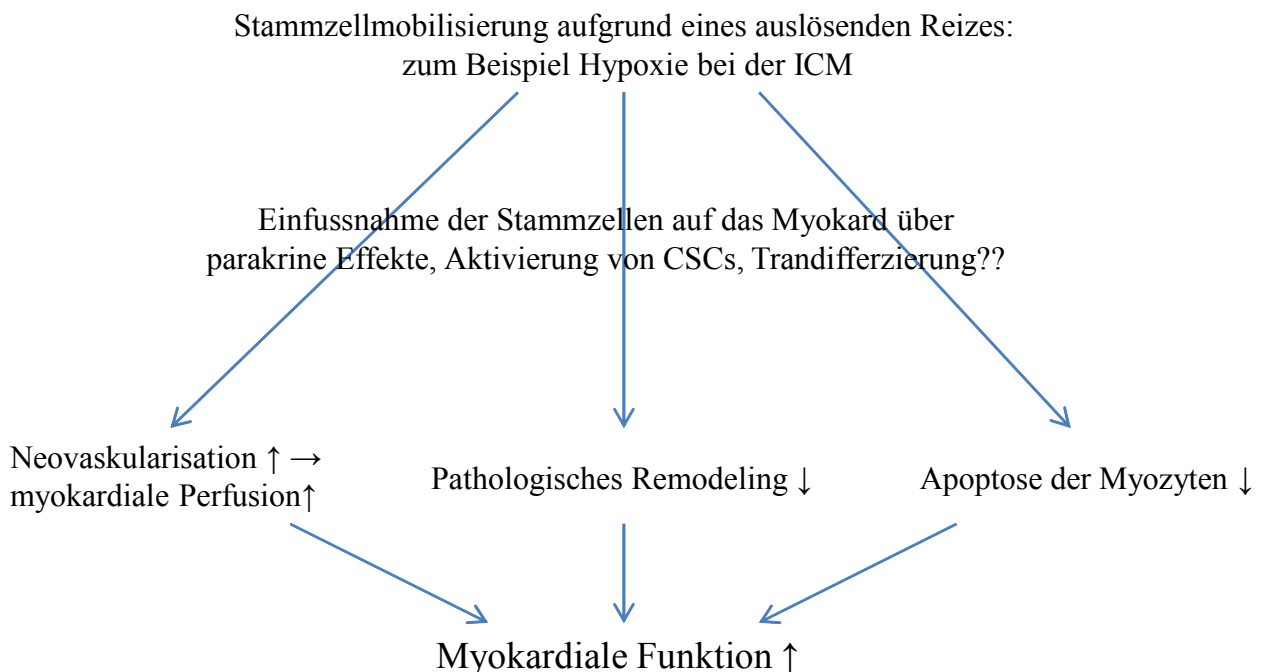


Abbildung 1: Effekte der Stammzellen auf ein geschädigtes Myokard modifiziert nach Engelmann [1]

## 1. Einleitung

### **1.4.2 Die endogene Zirkulation der CD34<sup>+</sup>-Stammzellen**

Am besten erforscht ist die endogene Stammzellzirkulation bei der ischämischen Kardiomyopathie (= ICM). Physiologischer Weise werden die hämatopoetischen Stammzellen Zytokin getriggert bei Bedarf aus ihrer Nische im Knochenmark ausgeschüttet. Die in das Blut gelangten Zellen zirkulieren über die Blutbahn zum Herzen und migrieren dort in das geschädigte Herzmuskelgewebe. Diesen Prozess nennt man „Homing“. Die Aufnahme erfolgt über eine Interaktion der Oberflächenmarker der zirkulierenden Stammzellen mit den zugehörigen Liganden im Zielgewebe. Eine Übersicht über den Ablauf der Stammzellzirkulation am Beispiel der ischämischen Kardiomyopathie gibt Abbildung 2.

Die bekannteste Achse ist die CXCR-4/ SDF-1-Interaktion [68]/[69]. Der Oberflächenmarker Stromal derived factor 1 (= SDF-1) wird in vielen Geweben gefunden (neben Herz und Knochenmark unter anderem auch in Gehirn, Nieren und Leber). In den endothelialen Herzzellen wird SDF-1 durch den Hypoxie empfindlichen Transkriptionsfaktor HIF-1 (= hypoxia-induced Factor-1) aufreguliert und wirkt positiv chemotaktisch auf menschliche CD34<sup>+</sup>-Zellen. Unterstützt wird dieser Mechanismus von weiteren Faktoren wie IGF-1 und HGF-1 (= Hepatocyte-Growth-Factor). Sein korrespondierender Ligand ist der CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4 (= CXCR4, auch Stromal cell-derived factor 1 receptor genannt), der auf den zirkulierenden Stammzellen exprimiert wird.

Ein anderes wichtiges Rezeptor-Liganden System stellt c-Kit/ SCF dar. Diese Achse regelte das Homing von c-Kit<sup>+</sup>-Knochenmarksstammzellen. C-Kit findet sich sowohl bei den hämatopoetischen Stammzellen (CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/c-Kit<sup>+</sup>) als auch bei den residenten kardialen Stammzellen (CD45<sup>-</sup>/CD34<sup>+</sup>/c-Kit<sup>+</sup>). C-Kit<sup>+</sup>-Zellen unterstützen durch die Schaffung eines proangiogenetischen Milieus, unter anderem durch das Sezernieren von VEGF, die Selbstreparaturmechanismen des Herzens. Die Gruppe um Fazel markierte die c-Kit-Knochenmarkpopulation und konnte darüber eine verstärkte Migration in die Borderzone nach Myokardinfarkt nachweisen. In einem weiteren Schritt untersuchten sie Tiere mit defektem c-Kit-Rezeptor und stellten fest, dass keine Reparaturvorgänge abliefen und es in Folge zu einer schweren Herzschiädigung kam [70].

Eine weitere Achse stellen ICAM/ LFA-1 dar. Das interzelluläre Adhäsionsmolekül (= ICAM) ist der endotheliale Ligand für das Lymphozyten funktions-assoziierte Antigen-1 (=LFA-1). LFA-1 wird von den meisten Knochenmarksstammzellen exprimiert. Eine entscheidende Rolle spielt es vor

## 1. Einleitung

allein in der Rekrutierung von Leukozyten in entzündetes Gewebe. In diesem Zusammenhang ist auch VCAM-1/VLA-4 bekannt. Das Very Late Antigen-4 ist ein Oberflächenmerkmal der hämatopoetischen Stammzellen und in deren Weiterentwicklung der Leukozyten. Das vascular cell adhesion molecule-1 (= VCAM-1) ist sein endothelialer Ligand. Sowohl für ICAM, als auch VCAM-1 konnte gezeigt werden, dass sie in der Grenzzone des Herzinfarktes nach einer Therapie mit G-CSF aufreguliert waren [71]/[72].

Insgesamt finden sich also mehrer Interaktionsmechanismen von Homingrezeptoren und -faktoren, die die erfolgreiche Aufnahme der zirkulierenden Stammzellen ins Herz ermöglichen. Dies stellt die Basis für Stammzelltherapien bei Herzerkrankungen dar.

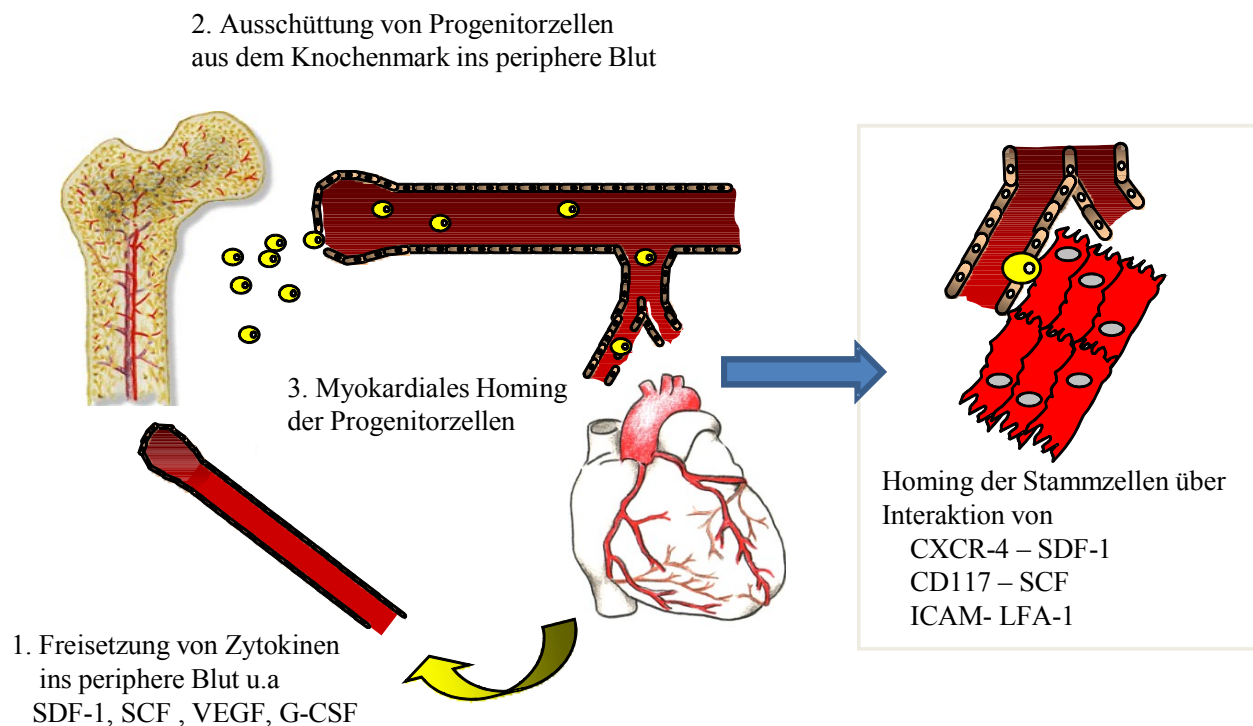


Abbildung 2: schematische Darstellung des myokardialen Homings bei ICM (modifiziert nach [2])

Auf diese Basis untersuchten Theiss et al. in einer klinischen Studie das Verhalten von  $CD34^{+}$ -Progenitorzellen bei Patienten mit einer idiopathischen dilatativen Kardiomyopathie im Vergleich zur ischämischen Kardiomyopathie [3]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die gesuchten Populationen ( $CD34^{+}CD31^{+}$ ,  $CD34^{+}CD117^{+}$ ,  $CD34^{+}CD133^{+}$ ,  $CD34^{+}CXCR4^{+}$ ) im peripheren Blut



## 1. Einleitung

bei beiden Kardiomyopathieformen im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe signifikant erhöht waren. Diese deutlich erhöhten Spiegel fielen nach einer Herztransplantation wieder ab. In den explantierten Herzen erfolgte mittels Real-Time PCR eine Untersuchung auf myokardiale Homingfaktoren, unter anderem SDF-1, SCF, VCAM und ICAM. Hier wurde festgestellt, dass diese bei der idiopathischen DCM im Gegensatz zur ICM auf mRNA-Ebene herunterreguliert waren. Dies ließ die Vermutung nahe erscheinen, dass die fehlende Aufregulierung der korrespondierenden Faktoren im Herzen die Migration der Stammzellen bei idiopathischer dilatativer Kardiomyopathie verhindert (siehe Abbildung 3).

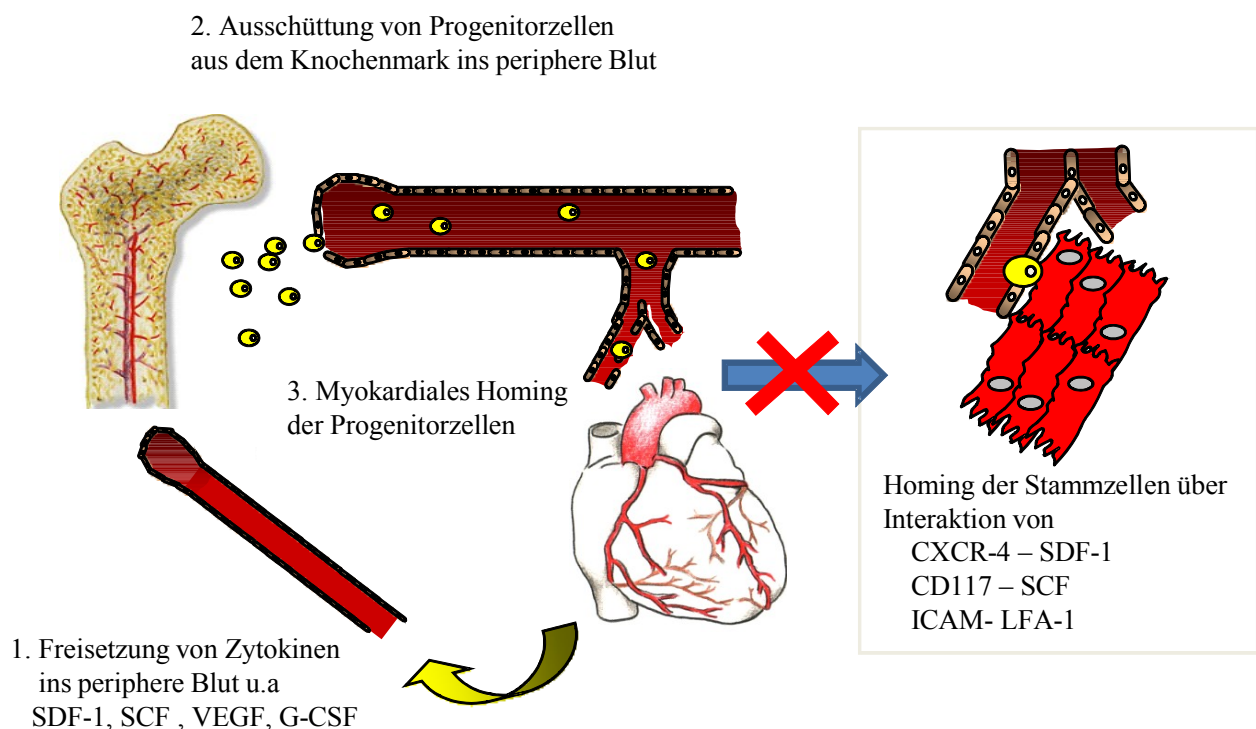


Abbildung 3: vermindertes myokardiales Homing bei der DCM nach Theiss et al. [3]

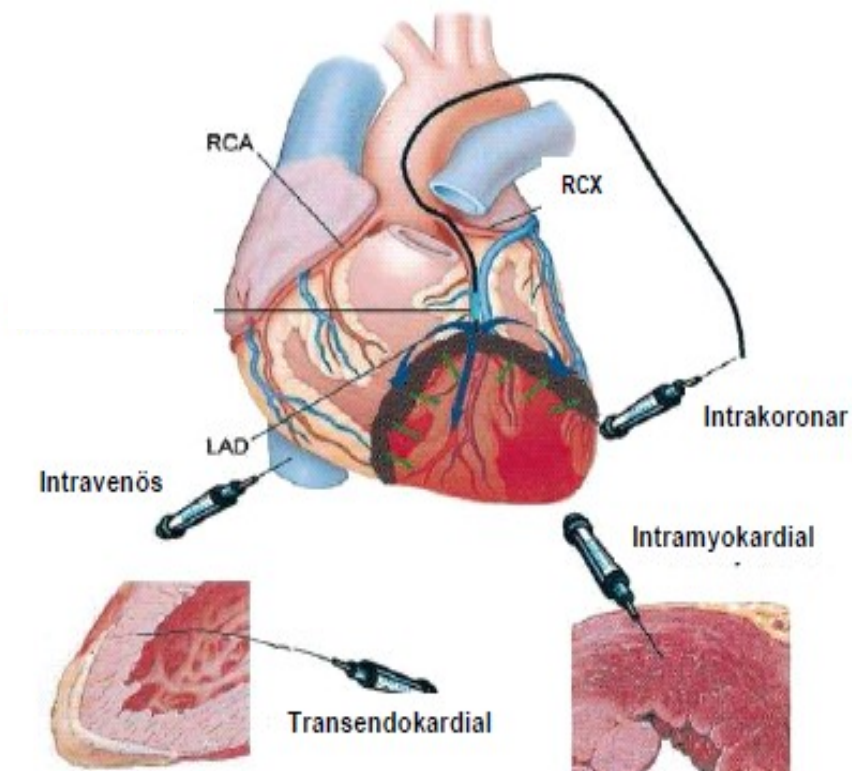
Aufgrund dieser Erkenntnis beschlossen wir, die genauen Verhältnisse der endogenen Stammzellen und ihres Homingverhaltens in einem murinen Modell zu erforschen. Unser Ziel war es, genauere Einblicke in die Pathophysiologie zu gewinnen, um im Anschluss daran neue therapeutische Möglichkeiten zu finden.

## 1. Einleitung

### **1.4.3 Technische Applikationsmöglichkeiten adulter Stammzellen**

Zur Zeit stehen der klinischen Forschung verschiedene Möglichkeiten der direkten Stammzellapplikation zur Verfügung. Am besten erforscht sind die verschiedenen Möglichkeiten im kardiologischen Bereich bei den Folgeschäden des Myokardinfarktes. Das Spektrum umfasst die Katheter-basierte intrakoronare Applikation, transendokardiale Gaben, intramyokardiale Injektionen [73]/[74] oder die direkte Transplantation [75].

Abbildung 4 zeigt die verschiedenen Applikationsmöglichkeiten.



*Abbildung 4: die verschiedenen Möglichkeiten der direkten Stammzellapplikation modifiziert nach Strauer [4]*

Gemeinsam ist ihnen, dass die am häufigsten verwendeten Stammzellquellen das Knochenmark und das periphere Blut sind. Die Zellen werden mittels Punktion (KM) oder Aphaese (Blut) gewonnen und dann mit Hilfe des gewählten Verfahrens direkt in das Herz eingebracht [76]/[77] [74]/[73]/[78].

Generell sind diese Methoden technisch gut durchführbar, außerdem wurde in einigen Studien eine

## 1. Einleitung

verbesserte kardiale Funktion nachgewiesen [79]/[80]/[81-85]. Bei der myokardialen Injektion ist ein weiterer positiver Aspekt, dass die Zellen direkt in hoher Anzahl in die makroskopische sichtbare Borderzone des Infarktes gespritzt werden konnten [75]. Nachteile der unmittelbaren Gabe zeigte unter anderem Menasche et al. In seiner Studie beschrieb er eine gesteigerte Rate von Kammerflimmern und ventrikulären Tachykardien nach der Transplantation von Myoblasten bei den Empfängern [86]. Ein weiterer Nachteil ist die teilweise sehr kurze Verweildauer der injizierten Zellen [87]/[88].

### **1.4.4 Stammzellmobilisation mittels G-CSF**

Die Ausschüttung endogener Stammzellen aus dem Knochenmark ist eine mögliche attraktive nicht-invasive Alternativstrategie [89]. Der Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) ist bis jetzt das am besten untersuchte Zytokin. Er stimuliert die Proliferation und Freisetzung von verschiedenen Knochenmarkzellen, einschließlich der CD34<sup>+</sup>-Subpopulationen (siehe unten). Bekannt als Medikament ist G-CSF vor allem bei immunsupprimierten Patienten unter Chemotherapie, um die Anzahl der neutrophilen Granulozyten anzuheben oder nach Knochenmarkstransplantation [90]/[91]. Was G-CSF besonders attraktiv für die kardiologische Forschung macht, ist dass es seit vielen Jahren für den klinischen Einsatz zugelassen ist und somit nachweislich ein sicheres Anwendungsprofil besitzt [92]. Des weiteren wird es kommerziell produziert.

G-CSF (= Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor) ist ein Glykoprotein. Es besteht aus 178 Aminosäuren und besitzt eine Molekülmasse von 19,6kDa [93]. Physiologischer Weise wird es unter anderem von Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten und hämatopoetischen Zellen gebildet. Aber auch verschiedene andere Zelllinien wie Fibroblasten, Endothelzellen, Astrozyten und Knochenmark-Stromazellen können G-CSF produzieren [94]. Ein typischer Reiz zur G-CSF-Ausschüttung ist physiologischer und pathologischer Stress wie zum Beispiel eine Sepsis [95] oder nach einem akutem Myokardinfarkt [96]/[97].

Der Wirkort zur Ausschüttung von HSC ist das sogenannte Microenvironment (= Zellumgebung) im Inneren des Knochenmarks. Das G-CSF, ob endogen oder exogen zugeführt, bindet dort an seinen spezifischen Oberflächenrezeptor, den G-CSF-Rezeptor (= G-CSFR oder CD114).

## 1. Einleitung

Exprimiert wird der G-CSFR unter anderem auf den hämatopoetischen Zellen, endothelialen Progenitorzellen, neuronalen Zellen, aktivierter T-Lymphozyten und auch Kardiomyozyten [98]/[99] [94, 100]. Daneben kann G-CSF auch noch die Ausschüttung einer Reihe von Zellen aus dem Knochenmark fördern, die keinen G-CSFR ausbilden, wie Erythrozyten und Megakaryozyten [101]. Im Knochenmark kann G-CSF, an unterschiedlichen Stellen mit Rezeptoren und Liganden interagieren und somit auf verschiedenen Wegen die Mobilisation der hämatopoetischen Stammzellen in das periphere Blut fördern. Eine Schlüsselrolle nimmt auch hier wieder die Achse SDF-1/CXCR4 ein. Das Chemokin SDF-1, das von den Stromazellen im Knochenmark produziert wird, und CXCR4 sind für das Überleben, die Adhäsion und die Freisetzung von hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark [102] von größter Bedeutung. Sowohl Petit et al. als auch Semerad et al. stellten nach G-CSF-Behandlung ein deutliches Absinken des SDF-1-Spiegels im Knochenmark fest. Dabei korrelierte das Ausmaß der Verringerung gut mit der Menge an ausgeschütteten Stammzellen [103]/[104]. Weiterhin vermindert G-CSF ebenfalls die Expression von CXCR4, was wiederum zur vermehrten Mobilisation der HSCs führt [105]/[106].

G-CSF aktiviert im Knochenmark die neutrophilen Granulozyten. Diese schütten dann Proteasen aus, hauptsächlich Neutrophilen-Elastase und Cathepsin-G, die zu einer N-terminalen Spaltung von SDF-1 führen [107]/[108]. Weiterhin sezernieren die Neutrophilen auch die Matrix-Metalloproteinase-9 (= MMP-9). Die MMP-9 induziert die Spaltung von den Adhäsionsmolekülen VLA-4 und c-Kit. Auch die Arbeit von Heissig et al. zeigt, dass in MMP-9-Knockout-Mäusen die Stammzellmobilisation mittels G-CSF deutlich reduziert war [109].

Ebenso kann G-CSF die Serin-Protease CD26 (Dipeptidylpeptidase IV; DPPIV) induzieren. CD26 ist auf bestimmten hämatopoetischen Stammzellen extrazellulär membrangebunden und kann ebenfalls durch proteolytische Spaltung SDF-1 inaktivieren. Die Therapie mit G-CSF führte *in vitro* in Folge der gesteigerten Expression von CD26 zu einem verringertem Ansprechen von CD34<sup>+</sup>-Stammzellen auf SDF-1 [110]/[111]. Daher scheint eine gleichzeitige Behandlung mit G-CSF und einem CD26-Inhibitor zur Verbesserung des „Homings“ sinnvoll zu sein [112]. Ein Teil unserer Arbeitsgruppe beschäftigte sich in einem weiteren murinen Modell erfolgreich damit, bei Mäusen mit einer ischämischen Kardiomyopathie infolge eines Myokardinfarktes die DPPIV zu blockieren. Durch die gleichzeitig Applikation von G-CSF konnte auf diesem Weg die bestehende ICM abgemildert werden [113]/[114].

## 1. Einleitung

Abbildung 5 zeigt eine Übersicht über die Proteasen abhängigen und unabhängigen Wege der HSC-Mobilsiation aus dem Knochenmark.

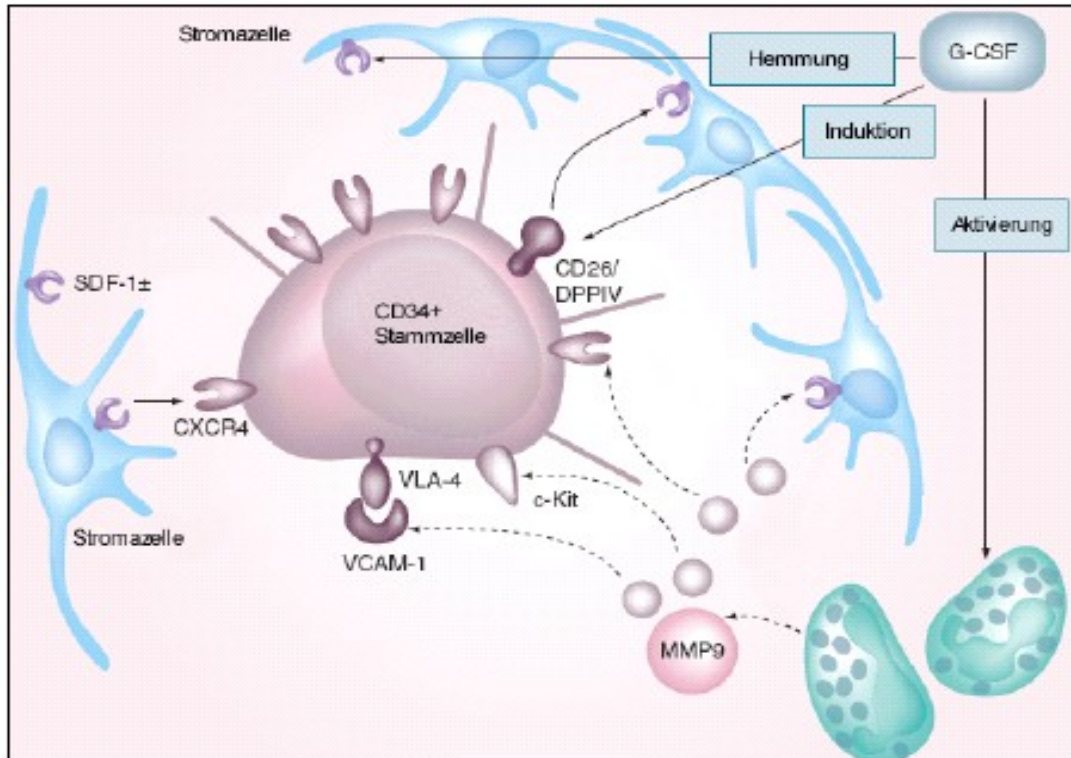


Abbildung 5: die verschiedenen Angriffspunkte des G-CSF modifiziert nach Frühauf [5]

#### 1.4.5 Klinische Studien mit G-CSF bei der ischämischen und der dilatativen Kardiomyopathie

Im Jahre 2001 wurde erstmals die Wirkung von G-CSF nach einem Myokardinfarkt in einem murinen Modell untersucht und man konnte bei den mit G-CSF behandelten Tieren eine deutlich niedrigere Mortalitätsrate nachweisen [115]. Diese Ergebnisse bildeten den Auftakt für viele Studien sowohl tierexperimentell [116]/[117]/[118]/[100, 119]/[120]/[71]/[121] als auch klinisch (siehe unten) über die Wirksamkeit von G-CSF.

Die meisten klinischen Arbeiten bestätigten, dass der Einsatz von G-CSF beim Menschen auch in der Kardiologie sicher möglich ist [122]/[123-130].

## 1. Einleitung

Tabelle 3 zeigt eine Zusammenfassung über die verschiedenen Studien mit G-CSF nach Myokardinfarkt.

In der ersten nicht Placebo-kontrollierten Arbeit von Kuethe et al. [124] zeigte sich eine verbesserte myokardiale Kontraktilität nach 7-tägiger G-CSF-Behandlung nach akutem Infarkt. Im SPECT (= Einzel-Photon-Emissions-Computertomographie) zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Auswurffraktion im Vergleich zur Kontrolle. Diese Daten wurden auch durch die Arbeiten von Valgimigli [127] und der Firstline-AMI-Studie [11,123] gestützt. In beiden Studien konnte eine signifikante Verbesserung der globalen Pumpfunktion nach G-CSF-Gabe nachgewiesen werden. Besonders deutlich fiel dieser Vergleich in der Firstline-AMI-Studie aus, in der sich eine Steigerung von  $6 \pm 4,8\%$  nach G-CSF-Intervention zu einer Verschlechterung von  $4 \pm 2,7\%$  ohne G-CSF zeigte. Takano bewies eine Steigerung der Ejektionsfraktion und eine deutliche Verkleinerung des Infarktareals mit nur einer sehr geringen Menge an G-CSF ( $2,5 \mu\text{g/kg KG}$  für 5d) [126].

Im Gegensatz dazu stehen andere Arbeiten, teilweise mit verbessertem Studiendesign (doppelverblindet, Placebo-kontrolliert) und größeren Patientenzahlen, die keinen positiven Effekt von G-CSF nachweisen. So stieg in der STEMMI-Studie [125] die Auswurffraktion in beiden Gruppen an (G-CSF:  $+8,5\%$  vs. Kontrolle:  $+8\%$ ) und auch hinsichtlich der Infarktgröße bestand kein Unterschied. In der G-CSF-STEMI-Studie unserer Gruppe konnte ebenfalls in diesen beiden Bereichen keine signifikante Differenz festgestellt werden [131]. Ebenfalls konnte auch die größte bislang veröffentlichte Arbeit, die REVIVAL-2-Studie [132], keinen positiven G-CSF-Effekt aufzeigen. Mittels MRT konnte nach 6 Monaten nur eine gering verbesserte Auswurffraktion (G-CSF:  $+0,5 \pm 3,8\%$  vs. Kontrolle:  $+2,0 \pm 4,9\%$ ) und kleinere Infarktgrößen (G-CSF:  $-6,2 \pm 9,1\%$  vs. Kontrolle:  $-4,9 \pm 8,4\%$ ) gemessen werden. Ellis verglich in einer kleinen Studie, ob die Menge des injizierten G-CSF eine ausschlaggebende Rolle spielt. In dieser Analyse konnte in allen Gruppen eine Steigerung der Herzleistung gezeigt werden, allerdings ohne Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen [133].

Ein Erklärungsansatz für die widersprüchlichen Daten ist möglicherweise der Zeitpunkt der ersten G-CSF-Gabe nach Intervention. So zeigten vor allem die Studien, die einen frühen Applikationszeitpunkt hatten, einer Steigerung der globalen Kontraktilität (siehe Tabelle 3).

## 1. Einleitung

Studie	n	Kontrolle	Dosis G-CSF	Zeitpunkt	Diagnostik	Effekte
<b>Kuethe</b> [124]	14	Keine Therapie	10 µg/kg KG für 7d	2 d nach PCI	SPECT	Globale Kontraktilität ↑ in G-CSF-Gruppe
<b>Valgimigli</b> [127]	20	Placebo	5 µg/kg KG für 4d	24 Std. nach PCI	SPECT	Globale Kontraktilität ↑ in G-CSF-Gruppe
<b>Firstline-AMI</b> [11, 123]	50	Keine Therapie	10µg/kg KG für 6d	90 min nach PCI	ECHO	Globale Kontraktilität ↑ in G-CSF-Gruppe
<b>Takano</b> [126]	40	Placebo	2,5µg/kg KG für 5d	24 Std. nach PCI	SPECT	Globale Kontraktilität ↑ Infarktgröße ↓ in G-CSF-Gruppe
<b>REVIVA L-2</b> [132]	114	Placebo	10µg/kg KG für 6d	5 d nach PCI	MRT	Globale Kontraktilität ↑ Infarktgröße ↓ in bd. Gruppen
<b>STEMMI</b> [125]	78	Placebo	10µg/kg KG für 5d	30 Std. nach PCI	MRT	Regionale Herzfunktion ↑ EF ↑ in bd. Gruppen
<b>GCSFSTEMI</b> [131]	44	Placebo	10µg/kg KG für 5d	31 Std. nach PCI	MRT	Globale Kontraktilität ↑ Infarktgröße ↓ in bd. Gruppen Perfusion ↑ in G-CSF-Gruppe
<b>Ellis</b> [133]	18	Placebo	5µg/kg KG für 5d 10µg/kg KG für 5d			Globale Kontraktilität ↑ in allen drei Gruppen

*Tabelle 3: Klinische Studien nach akutem Myokardinfarkt und in dessen Folge der ICM;*

*PCI: perkutane Koronarintervention; MRT: Magnetresonanztomographie; SPECT: Einzel-Photon-Emissions-Computertomographie; d: Tag; KG: Körpergewicht*

Die Gabe von G-CSF bei der dilatativen Kardiomyopathie ist bis zum jetzigen Zeitpunkt kaum erforscht. In letzter Zeit beginnen erste Forschungen über eine mögliche Therapieoption mit G-CSF. In 2006 wurde in einem Studiendesign eine dilatative Kardiomyopathie mittels Adriamycin bei Ratten ausgelöst und anschließend mit G-CSF (50mg/kg KG für 8 Tage) behandelt. In diesem Modell konnte gezeigt werden, dass Applikation von G-CSF die Apoptoserate der Kardiomyozyten verringert und in Folge die kardiale Pumpfunktion bei den behandelten Tieren anstieg [134]. 2006 veröffentlichte auch die Gruppe um Hüttmann die Ergebnisse ihrer klinischen Studie. Sie behandelten 16 männliche Patienten (9 = ICM und 7 = DCM) mit G-CSF. Im Verlauf wurde ein Anstieg im Bereich der körperlichen Belastung beim 6-Minuten-Gehtest und der Herzfunktion in der therapierten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet. Die Gruppe stellte die

## 1. Einleitung

Vermutung auf, dass die autologen Stammzellen über parakrine Stimulierung (siehe Abbildung 1) auf Parenchym- oder Gefäßzellen wirkten und sie in ihrem Wachstum und Überleben fördern. Allerdings konnte in diesem Modell ein gewisser Trainingseffekt als Ursache der Leistungssteigerung nicht sicher ausgeschlossen werden, da die erkrankten Probanden im Gegensatz zur Kontrollgruppe häufiger das Laufband betraten [135].

Aktuell veröffentlichten Bocci et al. ihre Ergebnisse einer klinischen Studie [136]. In dieser untersuchten sie 23 Patienten mit nicht-ischämischer Kardiomyopathie, die mit G-CSF behandelt wurden. 14 Erkrankte erhielten die alleinige Applikation von G-CSF zur Stammzellmobilisation, 8 Herzpatienten wurden zusätzlich mit einer intrakoronaren Infusion der mobilisierten peripheren Blutstammzellen therapiert. In beiden Gruppen ergaben die Folgeuntersuchungen eine gesteigerte Herzleistung im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (17 Patienten).

Diese Ergebnisse und auch die positiven Befunde nach der Stimulation von G-CSF bei Myokardinfarkt lassen insgesamt hoffen, dass G-CSF ein geeigneter Therapieansatz bei der DCMi sein könnte.



## **1.5 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit**

Wie in 1.4. erläutert, ist das Ziel dieser Arbeit die genaue Evaluation der endogenen CD34<sup>+</sup>-Stammzellpopulationen im murinen Modell, um Rückschlüsse über potentielle therapeutische Optionen zu erlangen.

Ziel des ersten Teiles der Arbeit ist es, die Ausbildung einer virusbedingten dilatativen Kardiomyopathie und der damit verbundenen Auswirkungen auf die zirkulierenden endogenen CD34<sup>+</sup>-Stammzellpopulationen und myokardialen Homingfaktoren nachzuweisen:

1. Verifizierung der postinflammatorischen DCM mittels Herzkatheteruntersuchung und histologischer Schnitte
2. Beurteilung der unterschiedlichen kardialen Homingfaktoren anhand der Real-Time PCR (VCAM-1, SDF-1, SCF, ICAM, P-Selectin)
3. Analyse der unterschiedlichen Stammzellpopulationen sowohl in Blut, Knochenmark, als auch im Herzen mit Hilfe der Durchflusszytometrie (= FACS). Betrachtet wurden:  
CD34<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup> und -/ VLA-4<sup>+</sup>  
CD34<sup>-</sup>/CD45<sup>-</sup>/Sca-1<sup>+</sup> und -/c-Kit<sup>+</sup>
4. Genauere Evaluation des VCAM-1 auf Proteinebene mittels ELISA

Nachdem wir im ersten Teil der Arbeit nachweisen konnten, dass bei Mäusen der myokardiale Homingfaktor VCAM-1 aufreguliert ist und somit die Migration der Stammzellen potentiell möglich ist, nützen wir diese Erkenntnisse, um die Tiere mit G-CSF zu stimulieren. Unser Ziel war, mit Hilfe des G-CSF eine Verbesserung der kardialen Funktion zu erreichen und im zweiten Teil die Effektivität der gewählten Therapie nachzuweisen:

1. Analyse der oben genannten Stammzellpopulationen nach G-CSF-Therapie mittels FACS
2. Beurteilung der Veränderung im Herzmuskel nach G-CSF-Gabe in der Histologie und Immunhistologie
3. Messung der kardialen Funktion vor und nach G-CSF-Stimulierung mit Hilfe des kardialen MRT

### 1.6 Versuchsaufbau

#### 1.6.1 Verifizierung der DCM und Analyse der zirkulierenden endogenen CD34+-Stammzellpopulationen

4 Wochen alte Mäuse vom Stamm SWR/J (H-2<sup>q</sup>) wurden einmalig mit 10<sup>5</sup> pfu Coxsackievirus B3 (CVB 3) intraperitoneal (i.p.) infiziert. Der Zeitpunkt der Messungen wurde auf 12 Wochen post infectionem (p.i.) festgesetzt. Die Hälfte der Tiere erhielt eine Herzkathetermessung zur Evaluierung der linksventrikulären Funktion und des enddiastolischen Diameters. Der andere Teil wurde mittels Durchflusszytometrie (FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting) hinsichtlich der verschiedenen adulten Stammzellpopulationen im Blut, Knochenmark und Herz analysiert. Den Mäusen wurde unmittelbar nach dem ersten Experiment das Herz für weitere Untersuchungen, wie Histologie, Real-Time-PCR und ELISA, entnommen. Gesunde, gleich alte Mäuse des Stammes SWR/J (H-2<sup>q</sup>) dienten als Kontrollgruppe. Eine schematische Darstellung des Versuches ist in der folgenden Abbildung 6 ersichtlich.

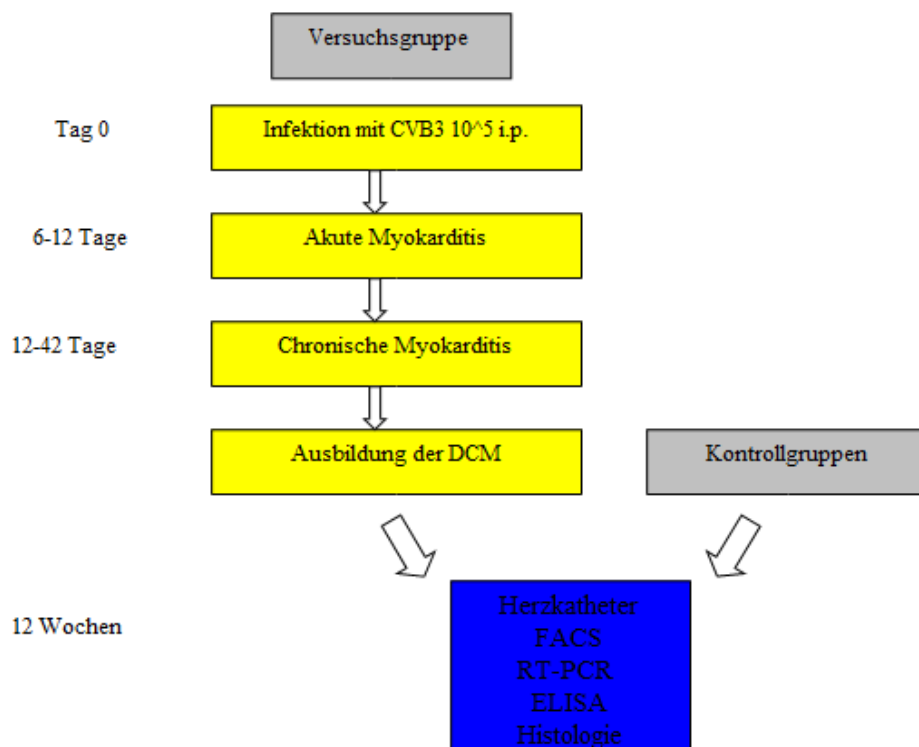


Abbildung 6: schematische Abbildung des ersten Versuchsteiles

## 1. Einleitung

### **1.6.2 Veränderungen der endogenen Stammzellzirkulation nach G-CSF-Applikation und deren Auswirkungen auf die kardiale Funktion**

Im zweiten Teil des Projektes wurden erneut SWR/J (H-2<sup>q</sup>) mit dem CVB3 ( $1 \times 10^5$  pfu i.p.) zum Zeitpunkt 0 infiziert.

Nach 2 Monaten erfolgte bei allen Tieren eine erste Evaluation der kardialen Leistung mittels MRT, um einen Ausgangswert zu erhalten. Im Anschluss an die Untersuchung wurden die Tiere randomisiert auf die folgenden Gruppen aufgeteilt: 1) Behandlung mit G-CSF ( $100\mu\text{g/kg/KG}$ ) i.p. und 2) Behandlung mit Saline i.p. Die Behandlung umfasste 14 Tage, wobei die Tiere 5 Injektionen pro Woche erhielten. Nach weiteren 2 Wochen wurde ein weiterer MRT-Scan durchgeführt. Analog zu dem ersten Versuchsteil wurden die Herzen im Anschluss für Histologie, Immunhistologie und kardialen FACS weiter aufbereitet. Abbildung 7 zeigt das durchgeführte Versuchsdesign.

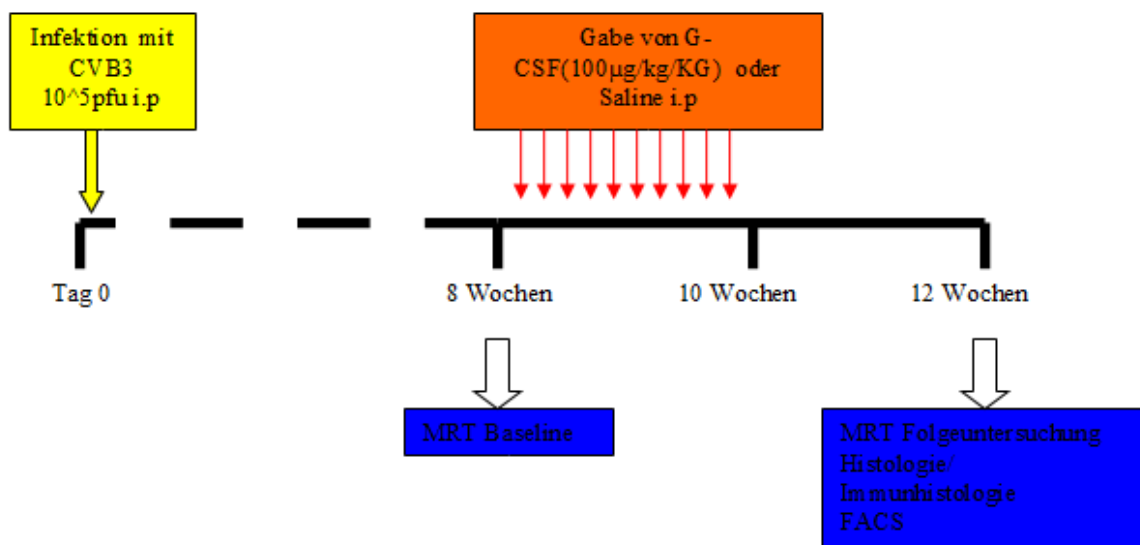


Abbildung 7: schematische Darstellung des zweiten Versuchsteiles

## **2. Material und Methoden**

Markennamen wurden in der gesamten vorliegenden Arbeit nicht explizit gekennzeichnet und alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in per analysis (= von höchstem Reinheitsgrad) bezogen.

### **2.1 Materialien**

#### **2.1.1 Allgemeine Chemikalien und Lösungsmittel**

Aqua ad injectabilia	B Braun, Melsungen
Chloroform	Merck, Darmstadt
EDTA (Dinatriumsalzdihydrat)	Roth, Karlsruhe
Eisessig, Acetic acid glacial	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol 96 %, vergällt	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ficoll-Paque PLUS	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Formalin (Formaldehyd 4 %)	Roth, Karlsruhe
H <sub>2</sub> O dest.	Millipore, Billerica, USA
Isopropanol (2-Propanol)	Roth, Karlsruhe
Isotone Natrium-Chlorid-Lösung	B Braun, Melsungen
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Invitrogen, Carlsbad, USA
TRIS (hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe

## 2. Material und Methoden

### **2.1.2 allgemeines Operationszubehör**

Baktolin wash	Bode Chemie, Hamburg
Braunol-Lösung	B Braun, Melsungen
Dreieckige Saugtupfer unsteril (SUGI)	Kettenbach Medical, Eschenburg
Chirurgisches Nahtmaterial (Ethibond excel, Prolene)	Ethicon, Norderstedt
Chirurgisches Operationsbesteck	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
Durapore 1,25 cm x 9,1 m	3M Health Care, Neuss
Feather disposable Scalpel No. 11	Feather safety razor, Osaka, Japan
Haushaltsfaden cotton	Gütermann, Gutach
Leukosilk S	Durapore TM HealthCare, Neuss
Mehrzweckgefäß mit Schnappdeckel 50ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Microlance 3 Einmal-Injektions-Kanülen der Größen 0,9mm x 40mm und 0,3mm x 13mm Parafilm	Becton Dickinson, Heidelberg Pechiney Plastic Packaging, Menasha, USA
Schutzhandschuhe unsteril (sempercare)	Semperit, Wien, Österreich
Spritzen zu 1 und 2 ml (BD plastipak)	Becton Dickinson, Heidelberg
Spritzen BD Micro-Fine + 1 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterillium	Bode Chemie, Hamburg
Zellstoff-Ecken (Zelletten)	Lohmann & Rauscher, Rengsdorf

### **2.1.3 Laborgeräte und sonstige Materialien**

Autoklav Varioklav Dampfsterilisatoren	H + P Labortechnik, Oberschleißheim
Blutbild-Analyser Sysmex XE-2100	Sysmex Deutschland, Norderstedt
Cellstar TC-Tube steril 14 ml	Greiner bio-one

## 2. Material und Methoden

Chemikalienlöffel	Roth, Karlsruhe
Cryotubes TM Vials	Nunc, Dänemark
Eppendorf Cups 1,5 ml/2ml	Eppendorf, Hamburg
Elektrophorese E 802 mit Gelkammern	Consort, Turnhout, Belgien
Finnpipette	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Finntip Stepper 5,0 ml, 50 Stück	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Floureszenz-Kamera Gel Doc 2000	BioRad, Hercules, USA
Gefrierschrank Hera freeze -80°C	Heraeus Holding, Hanau
Glaszylinder, 500 ml	Schott, Mainz
Heizblock HTM 130	HLC BioTech, Bovenden
Kühlschrank/Gefrierschrank Premium	Liebherr, Biberach
Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop-Photokamera Axio Cam HRc	Carl Zeiss, Jena
Mikrowelle Microwave 800	Severin Elektrogeräte, Sundern
Multipipette (20-200 µl)	Eppendorf, Hamburg
Petrischale Steriplan	Roth, Karlsruhe
Pipetten 2,5/20/200/1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Rotilabo Reaktionsgefäßständer	Roth, Karlsruhe
Schüttelgerät Polymax 10/40	Heidolph Instruments, Schwabach
Thermocycler Biometra t-personal combi	Biometra, Göttingen
Ultraschallhomogenisator Sonopuls	Bandelin Electronic, Berlin
Vortex-Genie	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage	Scout Pro Ohaus, Giessen
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus Holding, Hanau
Zentrifuge Centrifuge 5415	Eppendorf, Hamburg

## 2. Material und Methoden

Zentrifuge Mikro 20	Hettich, Bäch, Schweiz
Zentrifuge Multifuge 3 L-R	Heraeus Holding, Hanau
Zentrifugenröhrchen 15 ml/50 ml	Techno Plastic Products, Trasadingen, Schweiz

### **2.1.4 Pharmaka**

Dexpanthenol (Bepanthen Augensalbe)	Roche, Grenzach-Wyhlen
Heparin-Na 25000 IE	B Braun, Melsungen
Ketaminhydrochlorid (Ketamin-Inresa5%)	Inresa, Freiburg
Xylazinhydrochlorid (Rompun 2%)	Bayer, Leverkusen
Fentanyl	Janssen, Neuss
Midazolam (Midazolam 5mg/5ml)	Ratiopharm, Ulm
Medetomidin (Domitor 1mg/1ml)	Pfizer, Berlin
Naloxon (Naloxon 0,4mg/1ml)	Inresa, Freiburg
Atipamezol ( Antisedan 5mg/1ml)	Pfizer, Berlin
Flumazenil (Flumazenil 0,1mg/1ml)	Delta Select, Pfullingen
g-csf (100µg/kg/d)	Amgen Biologicals, München
cDNA geniertes CVB 3 (Nancy strain, 3 malMPI für Biochemie, Martinsried herzpassagiert)	

### **2.1.5 Herzkatheter-Zubehör**

Enzymlösung	Millar Instruments, Houston, USA
Millar Tip-Katheter (1.4 French)	Millar Instruments, Houston, USA
OP- Mikroskop Stemi 2000	Carl Zeiss, Jena
Mouse-Ventilator Minivent 845	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten

## 2. Material und Methoden

Kaltlichtlampe/Quelle KL 1500	Opto, Gräfelting
Wärmeplatte mit Rektalkatheter TKM-0902	Föhr Medical Instruments, Seeheim
Dell Desktop PC Optiplex GX 260	Dell, Round Rock, USA
HSE Isoheart	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
MPCU2PV.exe	Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten
PVAN 2.9	Millar Instruments, Houston, USA
Millar Aria Pressure-Volume-Conductance System	Millar Instruments, Houston, USA

### **2.1.6 Materialien für das MRT**

Kleintier-EKG 1025-MR	SA Instrument inc., Stony Brook, NY
MRT-Spule (Durchmesser 2,3)	Philips Medizinsysteme, Best, NL
1,5T Philips Achieva MR Scanner	Philips Medizinsysteme, Best, NL
Kardiale Software, R1.2.2	Philips Medizinsysteme, Best, NL
Computersystem und Bedienkonsole	Philips Medizinsysteme, Best, NL

### **2.1.7 spezifisches Zubehör für die FACS-Analyse**

BSA (Bovines Serumalbumin)	Sigma, St.Louis, USA und Roth, Karlsruhe
Clenz-Reinigungslösung	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Collagenase IV	GibcoBrl, Eggenstein
FACS (Analysegerät) Coulter Epics XL-MCL	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Expo 32 ADC	Beckman Coulter, Fullerton, USA
FACS-Röhrchen	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Histopaque	Sigma-Altrich, Runnymede, UK



## 2. Material und Methoden

Sheath-Fluid	DAKO-Cytomation
Zellpack	Sysmex Deutschland, Norderstedt
<b>Antikörper:</b>	
FITC (Isotype Kontrolle)	BD Pharmingen, Heidelberg
PE (Isotype Kontrolle)	BD Pharmingen, Heidelberg
PerCP (Isotype Kontrolle)	BD Pharmingen, Heidelberg
CD34( FITC, anti.mouse)	BD Pharmingen, Heidelberg
CD31-(PE, anti.mouse)	BD Pharmingen, Heidelberg
CD45(LCA, PerCP, anti.mouse)	BD Pharmingen, Heidelberg
c-Kit (CD117, PE, anti.mouse)	BD Pharmingen, Heidelberg
CxCR4 (CD184, PE, anti.mouse)	BD Pharmingen, Heidelberg
Sca-1 (PE, anti.mouse)	BD Pharmingen, Heidelberg
VLA-4 (PE, anti.mouse)	BD Pharmingen, Heidelberg
Cd3e	BD Pharmingen, Heidelberg
CD45R/B220	BD Pharmingen, Heidelberg
Gr-1	BD Pharmingen, Heidelberg
Mac-1	BD Pharmingen, Heidelberg
TER-119	BD Pharmingen, Heidelberg
Sca-1-FITC	BD Pharmingen, Heidelberg
Streptavidin-PerCP	BD Pharmingen, Heidelberg

### **2.1.8 Histologie und Immunhistologie**

Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop Axioskop 40	Carl Zeiss, Jena

## 2. Material und Methoden

Mikroskop-Photokamera Axio Cam HRc	Carl Zeiss, Jena
Axio Vision V4.3	Carl Zeiss, Jena
Eosin	BD Pharmingen, Heidelberg
Hämatoxylin	BD Pharmingen, Heidelberg
Masson	BD Pharmingen, Heidelberg
Trichrom	BD Pharmingen, Heidelberg
Asp175 (rabbit polyclonal anti-cleaved capase-3)	Cell Signaling Technology, Boston
VCAM-1 (goat anti-mouse)	Leinco Technologies Inc, St. Louis, Missouri
VCAM-1 (human anti-mouse)	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Heidelberg
IgG (negative control, species-and isotype-matched)	BD Pharmingen, Heidelberg
Vectastain Elite StreptABC	Vector Laboratories, INC., Burlingame, CA
HistoGreen	Linaris, Wertheim-Bettingen

### **2.1.9 Materialien für die Real Time PCR**

100 bp DNA-Leiter	New England Biolabs, Ipswich, USA
Agarose GTQ	Roth, Karlsruhe
cDNA Synthese Kit	Invitrogen, Karlsruhe
DNase I Amplification Grade Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
DNase I reaction buffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
Fluoreszenz-Kamera Gel Doc 2000	BioRad, Hercules, USA
Quantity One	BioRad, Hercules, USA
Omniskript RT-Kit beinhaltet:	Qiagen, Hilden
1. Buffer RT,	
2. dNTP 5 mM,	
3. Omniskript,	
4. RNase-free water	

## 2. Material und Methoden

Random-Primer (3μg/μl)	Invitrogen, Carlsbad, USA
RNAasin-Inhibitor	Promega, Madison, USA
SYBR Green Supermix (Taq-Polymerase, PCRBuffer)	BioRad, Hercules, USA
Stratagene MX4000, Multiplex Quantitative PCR System	Stratagene
QuantityOne	BioRad, Hercules, USA
TRI-Reagent (Trizol)	GibcoBRL, Eggenstein

### Primer:

mSDF-1a-up	Eurofins MWG Operon Ebersberg
mSDF-1a-lo	Eurofins MWG Operon Ebersberg
mSCF-up	Eurofins MWG Operon Ebersberg
mSCF-lo	Eurofins MWG Operon Ebersberg
mVCAM-up	Eurofins MWG Operon Ebersberg
mVCAM-lo	Eurofins MWG Operon Ebersberg
mICAM-up	Eurofins MWG Operon Ebersberg
mICAM-lo	Eurofins MWG Operon Ebersberg
mP-Selectin-up	Eurofins MWG Operon Ebersberg
mP-Selectin-lo	Eurofins MWG Operon Ebersberg
H4 up	Eurofins MWG Operon Ebersberg
H4 lo	Eurofins MWG Operon Ebersberg

## 2. Material und Methoden

### **2.1.10 Zubehör für das ELISA-Verfahren**

Kollagenase Typ IV 0,1 %

Invitrogen, Carlsbad, USA

Mouse sVCAM-1/CD106 Quantikine ELISA Kit R&D Systems, Minneapolis, USA  
beinhaltet:

4. Mouse sVCAM-1  
Mikrotitrierplatte 96 well
5. 4 Abdeckplatten
6. Mouse sVCAM-1 Conjugate
7. Mouse sVCAM-1 Standard
8. Mouse sVCAM-1 Control
9. Assay Diluent RD 1-21
10. Color Reagent A und B (= substrate Solution)
11. Stop Solution
12. Wash Buffer Concentrate
13. Calibrator Diluent RD 5-26

ELISA reader TECAN Genios

Tecan, Schweiz

XFlour TECAN Software

Tecan, Schweiz

### **2.1.11 Versuchstiere**

Alle Versuche wurden an 4 bis 16 Wochen alten Mäusen des Stammes SWR/J (H-2<sup>q</sup>) (Jackson Laboratory) unternommen. Dabei wurden die Vorschriften der Tierschutzverordnung eingehalten. Die Regierung von Oberbayern hat die durchgeführten Arbeiten genehmigt (Az: 55.2-1-54-2531-63-06). Eine weitere Genehmigung für dieses Tierversuchsvorhaben hat die Regierung von Baden-Württemberg (PA1/05) erteilt.

## 2. Material und Methoden

### **2.2. Methoden**

#### **2.2.1 Versuchstiere**

##### **2.2.1.1 Haltung der Mäuse**

Da sich einige Mäusestämme als natürlich resistent herausstellten, wurden alle Versuche mit Mäusen vom Stamm SWR/J (H-2<sup>q</sup>) (Jackson Laboratory) durchgeführt. Diese Art ist für die Infektion und die Ausbildung einer virusbedingten dilatativen Kardiomyopathie empfindlich [137]. Die Zucht, Infektion und Haltung der Tiere bis zum Abklingen der akuten Myokarditis erfolgte in einer Kooperation mit Frau Prof. Klingel und Dr. Sauter in Tübingen (Institut für molekulare Pathologie des Universitätsklinikums der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, Leitung: Prof. Dr. Kandolf). Nach artgerechter Überführung der Mäuse nach München blieben die Tiere bis zum Zeitpunkt der Messung im S2-Tierstall des Max-von-Pettenkofer-Instituts, LMU.

In beiden Tierräumen erfolgte die Versorgung wie folgt: die Käfige wurden mit zwei bis vier Tieren besetzt, der Tag- und Nachtrhythmus war strikt bei 12 Stunden. Die Luftfeuchtigkeit betrug 55% und die Raumtemperatur konstante 24°C. Die Mäuse erhielten pelletiertes Futter (Mäuse-/Rattenstandarddiät) und steriles Wasser ad libitum über Flaschen. Die Umsetzung der Tiere erfolgte einmal die Woche. Die gebrauchten Käfige wurden autoklaviert.

Genehmigungen für dieses Tierversuchsvorhaben lagen von der Regierung von Baden-Württemberg (PA1/05) und der Regierung von Oberbayern (Aktenzeichen 209.1/211-2531-117/02) vor.

## 2. Material und Methoden

### **2.2.1.2 Ausbildung einer akute Myokarditis**

Bereits 1985 entwickelten Kandolf und Hofschneider die Möglichkeit, das Cocksackievirus B3 aufzubereiten und zu vervielfältigen [138]. Wenig später zeigten und etablierten Klingel et al. die Möglichkeit, mit Hilfe des Cocksackievirus B3 eine Myokarditis und infolge eine DCM bei Mäusen auszulösen [139].

#### **2.2.1.2.1 Cocksackievirus B3**

Die Infektion der Mäuse erfolgte mit einer cDNA-generierten CVB3-Variante (Nancy strain) [138], die zur Erhöhung des myokarditischen Potentials dreimal in murinen Herzen passagiert und dann in Verozellkulturen vermehrt wurde. Das Virus wurde in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  plaque forming units (= pfu) in einem entsprechendem Zellkulturmedium bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Infektionsmenge wurden direkt vor dem Gebrauch aufgetaut, in 200µl PBS aufgenommen und anschließend im Wasserbad auf  $37^{\circ}\text{C}$  erwärmt.

#### **2.2.1.2.1 Die akute Infektion**

Die 4 Wochen alten SWR/J (H-2<sup>q</sup>) wurden einmalig mit einer Dosis von  $10^5$ pfu des Cocksackievirus B3 intraperitoneal infiziert.

Nach 6-12 Tagen zeigte die Versuchsgruppe typische Anzeichen der akuten Myokarditis: ein gesträubtes Fell, Blässe von Ohren und Schwanz, leichter Gewichtsverlust und eingeschränktes Fluchtverhalten. Nach 6 Wochen begann die Ausbildung einer dilatativen Kardiomyopathie. Erkennbar wurde die sich entwickelnde Herzinsuffizienz durch eine Gewichtszunahme der infizierten Mäuse. Die Gewichtssteigerung war durch sich ausbildende Ödeme bedingt. Die Tiere zeigten weiterhin ein gemindertes Fluchtverhalten.

### 2.2.2. Häodynamische Messungen

#### 2.2.2.1. Herzkatheter

##### 2.2.2.1.1 Grundprinzip des Katheterversfahrens

Die Conductance-Methode [140] ermöglicht es, an einer lebenden, narkotisierten Maus eine Herzkatheteruntersuchung durchzuführen. Mittels eines Conductance-Katheters mit integriertem Druck –Sensor (Millar Tip-Katheter 1.4 French) können, basierend auf der Bestimmung der sich im Herzzyklus ändernden elektrischen Leitfähigkeit des Blutes, die linksventrikulären Volumen und Drücke abgeleitet werden. Anhand dieser Methode lassen sich parallel zur Ventrikelaktion Frank-Starling-Kurven darstellen. An der Katheterspitze befinden sich 4 Messelektroden: 2 Innere und 2 Äußere. Die Spitze kommt in der linken Herzkammer so zum Liegen, dass sich die proximalen Elektroden unterhalb der Aortenklappe und die distalen Elektroden in der Herzspitze befinden (siehe Abbildung 8).

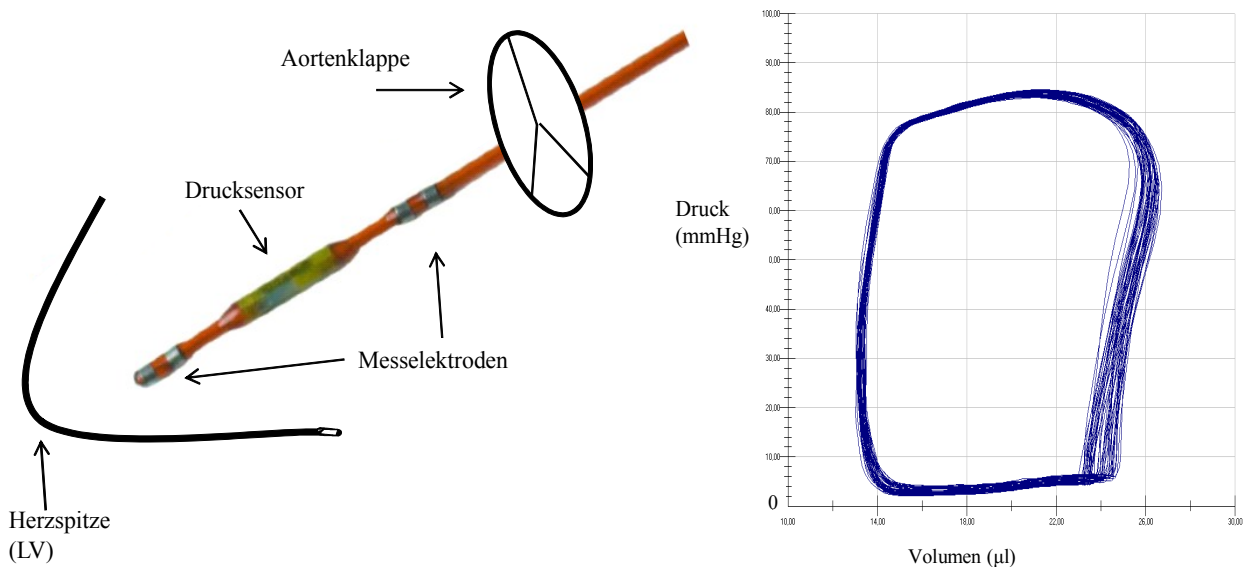


Abbildung 8: links: schematische Darstellung des Conductance-Katheters im linken Ventrikel; rechts: Druck-Volumen-Schleife einer gesunden Maus

## 2. Material und Methoden

Durch den Wechselstrom an den beiden äußeren Elektroden wird ein elektrisches Feld mit der Leitfähigkeit (Conductance)  $G(t)$  erzeugt. Ändert sich das intraluminale Blutvolumen  $V(t)$  hat das eine Veränderung der Leitfähigkeit  $G(t)$  zur Folge, diese Verschiebung wird wiederum von den zwei inneren Elektroden erfasst. Da die Elektroden nicht zwischen der Leitfähigkeit des Blutes und des umliegenden Gewebes  $G(p)$  differenzieren können, muss die parallele Conductance  $G(p)$  später rechnerisch abgezogen werden. Mit nachstehender Gleichung kann das linksventrikuläre Volumen  $V(t)$  aus der Leitfähigkeit berechnet werden:

$$V(t) = (l/\alpha) \times (l^2/\sigma_b) \times (G(t) - G(p))$$

$V(t)$ : zeitabhängiges ventrikuläres Volumen

$\alpha$ : Korrekturfaktor: Schlagvolumen<sub>Conductance</sub> / Schlagvolumen<sub>Referenzmethode</sub>

$L$ : Elektrodendistanz

$\sigma_b$ : spezifische Leitfähigkeit des Blutes

$G(t)$ : Gesamtleitfähigkeit

$G(p)$ : Leitfähigkeit des umliegenden Gewebes (parallele Conductance)

Wie oben bereits erwähnt, registrieren die Messelektroden nur die Leitfähigkeits-Veränderungen, ohne die unterschiedlichen Strukturen zu berücksichtigen. Deshalb muss das aus der Leitfähigkeit des umliegenden Gewebes ( $G(p)$ ) resultierende Volumen  $V(p)$  errechnet und von dem Gesamtvolumen  $V(t)$  abgezogen werden, damit man das reale Volumen erhält. Um diesen Wert ermitteln zu können, kam im vorliegenden Versuch die Methode der Injektion hypersaliner Kochsalzlösung zum Einsatz. An dem Ende einer Messung wurde mit Hilfe eines Jugularis-Katheter eine definierte Menge (10µl) 4,5%-iger NaCl-Lösung mehrfach injiziert. Dadurch änderten sich die Ventrikelvolumina und wurden parallel aufgezeichnet.

Mit Hilfe eines Diagramms kann nun der Wert des Volumen  $V(t)$  anhand des Schnittpunkts zweier Geraden an der y-Achse abgelesen werden. Die erste Gerade beinhaltet die gemessenen Werte während der Salineinjektion. Die zweite Gerade entspricht dem Zustand einer leeren Herzkammer und lässt sich anhand der Formel

Enddiastolisches Volumen( $V_{ed}$ ) = Endsystolisches Volumen ( $V_{es}$ )

abbilden.



## 2. Material und Methoden

### **2.2.2.1.2 Ablauf der Messung**

Am Untersuchungstag wurde die Maus mit einer Kombinationsinjektion (Medetomidin (0,5mg/kg) + Midazolam (5mg/kg) + Fentanyl (0,05mg/kg)) intraperitoneal betäubt. Die Wirkung trat nach ungefähr 5 Minuten ein und blieb bis zu eine Stunde bestehen. Bei Bedarf (erhöhte Toleranz oder verlängerte Versuchsdauer) wurde individuell nach dosiert.

Nach Eintreten der Narkose wurden die Extremitäten der Maus mittels Klebestreifen auf einer selbstregulierenden Wärmeplatte in Rückenlage fixiert. Während der Messung überwachte ein Rektalkatheter die Körpertemperatur und die Wärmeplatte hielt diese auf 37,5°C. Um die Intubation so schonend wie möglich durchzuführen, wurde der Oberkiefer der Maus mit Hilfe eines Gummibandes in Streckung gebracht und gerade gehalten. Die Intubation selbst erfolgte unter Sicht, d.h. es wurde ein circa 1 cm langer medianer Hautschnitt angelegt und die Trachea frei präpariert. Als Nächstes wurde der Unterkiefer mit einer Pinzette angehoben und vorsichtig eine stumpfe Metallkanüle (19Gauge) eingeführt. Nach Überwinden der Kehlkopfenge wurde der Tubus zunächst in der Luftröhre deutlich. An den gleichmäßigen und seitengleichen Bewegungen der Lungenflügel zeigte sich eine korrekte Lage. Der Tubus wurde fixiert und die Beatmung erfolgte mit einem Volumen von 200µl und einer Frequenz von 150 Zügen pro Minute.

Für die nachfolgende Präparation wurde die Maus unter das Operationsmikroskop umgelagert. Die Freilegung der rechten Arteria carotis interna (ACI) wurde bei einer 0,8fachen Vergrößerung durchgeführt. Zunächst wurde der Hautschnitt vorsichtig erweitert und anschließend mit Hilfe zweier stumpfer Pinzetten die rechte Karotisscheide vorsichtig freigelegt. Unter Schonung des Nervus Vagus, dessen Irritation hämodynamische Auswirkungen hätte, wurde die ACI zunächst langsam aus der Scheide gelöst und mit einem Metallspanner vom umliegenden Gewebe abgehoben. Jetzt wurde sowohl proximal als auch distal des Metallspanners ein Haushaltsfaden durchgezogen, locker verknotet und fixiert. Der kraniale Faden diente der Erhöhung des Blutrückstaus und der distale Faden verhinderte eine übermäßige Blutung während der Messung. Während der gesamten Operationsdauer wurde das Gewebe großzügig mit NaCl 0,9% gespült, um die Elastizität der ACI zu gewährleisten. Dank dieses Vorgehens stellt sich nun die rechte Arteria Karotis gut dar. Um besser arbeiten zu können, erfolgte eine Einstellung des OP-Gebietes auf eine höhere Vergrößerung. Mit einer kleinen Kanüle erfolgte dann die Punktion der Karotis. In das entstandene Loch wurde vorsichtig eine etwas größere, an der Spitze gebogene Kanüle eingeführt und die Vorderwand der ACI vorsichtig abgehoben. Jetzt konnte der Millar-Tip-Katheter mit Hilfe

## 2. Material und Methoden

einer ummantelten Pinzette in das Gefäßlumen eingeführt und in Richtung Herz vorgeschoben werden. Nach dem Überwinden der Mitralklappe wurde versucht, durch minimale Lageänderungen des Katheters die optimale Einstellung für die Messung zu erreichen. Ungefähr fünf Minuten lang wurden zunächst die Grundwerte der Herzleistung aufgezeichnet. Im Anschluss daran wurde die zur Berechnung des Realvolumens notwendige Salineinjektion (siehe 2.2.2.1.1) durchgeführt.

Nach Abschluss der Messung wurde die Maus durch eine Überdosis der Narkotika i.p. getötet. Die Messutensilien und der Tubus wurden entfernt. Als letztes wurde der Thorax zur Herzentnahme geöffnet.

### **2.2.2.1.3 Auswertung**

Die Daten des Millar Tip-Katheters wurden mittels eines Druckaufnehmer, Millar ARIA, in den Computer übertragen und mit dem Programm HSE Isoheart aufgenommen. Anhand der Software Millar PVAN 2.9 wurden die gemessenen Daten ausgewertet. Folgende Parameter waren von Bedeutung:

- Herzfrequenz (HF) in Schläge/min
- Schlagvolumen (SV) in  $\mu\text{l}$  = EDV–ESV
- Herzminutenvolumen (HMF= cardiac output (CO)) in  $\mu\text{l}/\text{min}$  = HF x SV
- Schlagarbeit (SW) = in mmHg x  $\mu\text{l}$

### **2.2.2.2 Magnetresonanztomographie (MRT)**

Um die Herzfunktion einer Maus nicht nur an einem Zeitpunkt beurteilen zu können, sondern auch im Verlauf, entschlossen wir uns im zweiten Versuchsteil für die hämodynamischen Messungen anstelle des Herzkatheters ein kardiales MRT durchzuführen. Der Vorteil des MRT-Scans ist, dass die Maus im Gegensatz zur Herzkathetermessung, bei welcher zwangsläufig der Exitus folgt, durch ein Antidot (siehe unten) geweckt und somit in ihrer Entwicklung beurteilt werden kann.

Die MRT-Durchführung erfolgte in Kooperation mit Frau Dr. Alexandra Keithahn (Nuklearmedizinische Klinik und Poliklinik Klinikum Rechts der Isar/TU München, Leitung: Prof. Dr. R. Botnar und Prof. Dr. M. Schwaiger).

## 2. Material und Methoden

### **2.2.2.2.1 Grundprinzip**

Der schematische Aufbau der einzelnen Komponenten einer MRT-Einheit zeigt Abbildung 9:

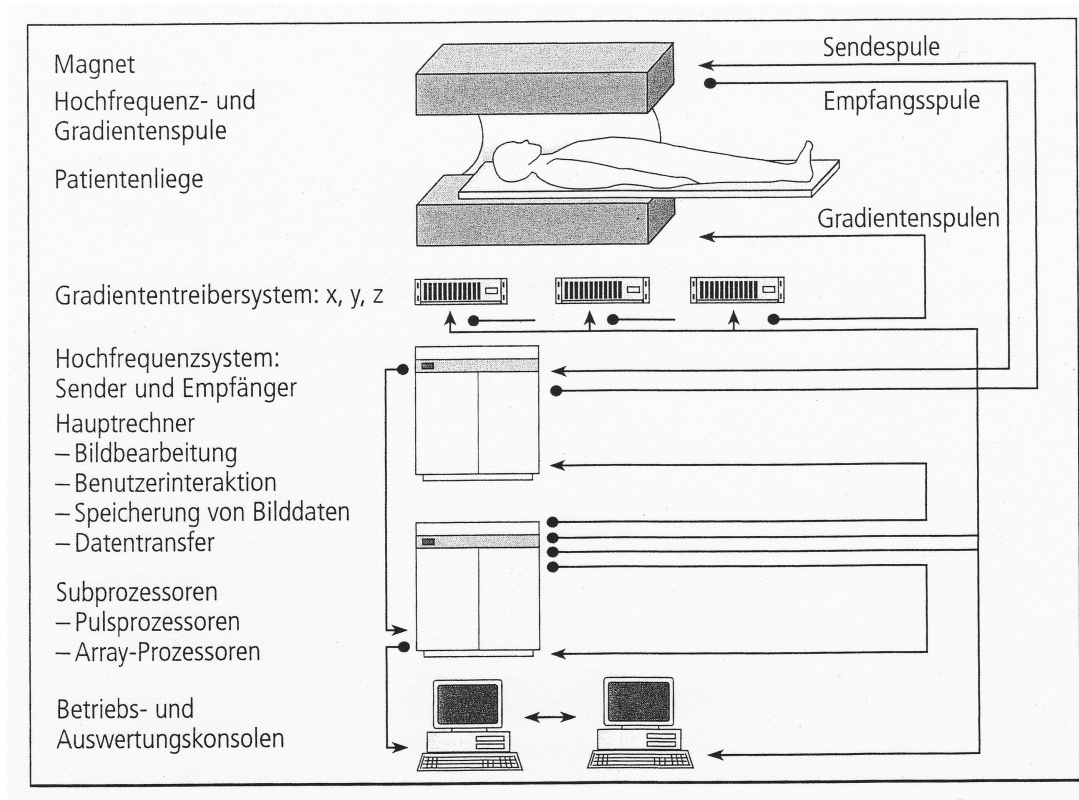


Abbildung 9: Komponenten eines MRT-Scanners modifiziert nach Rinck [6]

Die physikalische Grundlage für die Messung bildet die Kernresonanz. Protonen und Neutronen besitzen einen Spin (Eigendrehimpuls), durch welchen die Atomkerne einen magnetischen Moment erlangen. Werden diese dann in ein externes magnetisches Feld eingebracht, werden die Kerne aus ihrer Gleichgewichtslage ausgelenkt. Um aus den Signalen ein Bild erzeugen zu können, müssen die MR-Signale räumlich zugeordnet werden. Dies geschieht über die Anlage von Gradientenfelder in x-, y-, z-Richtung. Gradientenfelder sind zeitlich und räumlich variable Magnetfelder und werden durch Gradientenspulen erzeugt (Abbildung 10), die eine kurze Änderung des Magnetfeldes in eine beliebige Richtung bewirken.

## 2. Material und Methoden

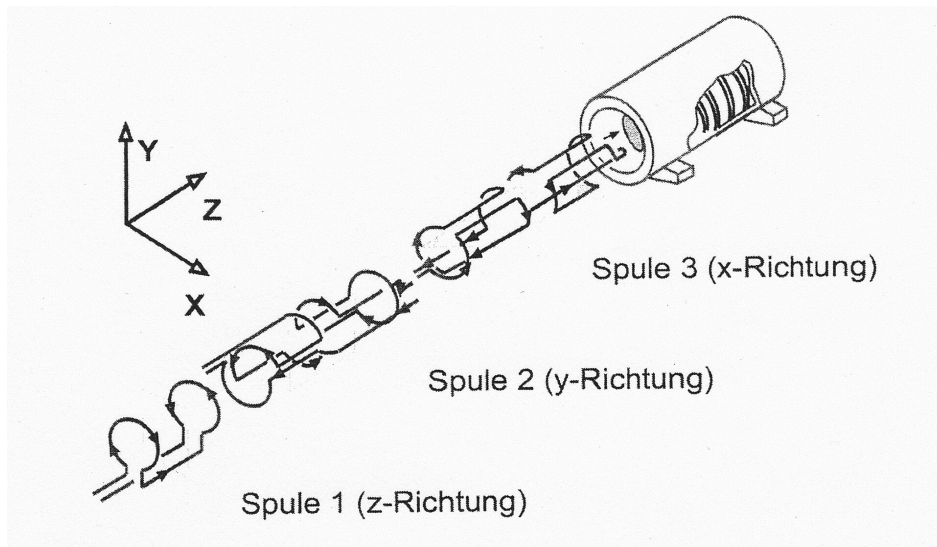


Abbildung 10: Ortskodierung und Auflösung mit Hilfe der Gradientenspulen (modifiziert nach Rinck [6])

Die empfangenen Signale werden digitalisiert und im Systemrechner in einer Rohmatrix abgelegt. Anhand diese Rohdaten berechnet der Computer das Bild (= Fourier-Transformation). Das Ergebnis zeigt Abbildung 11.

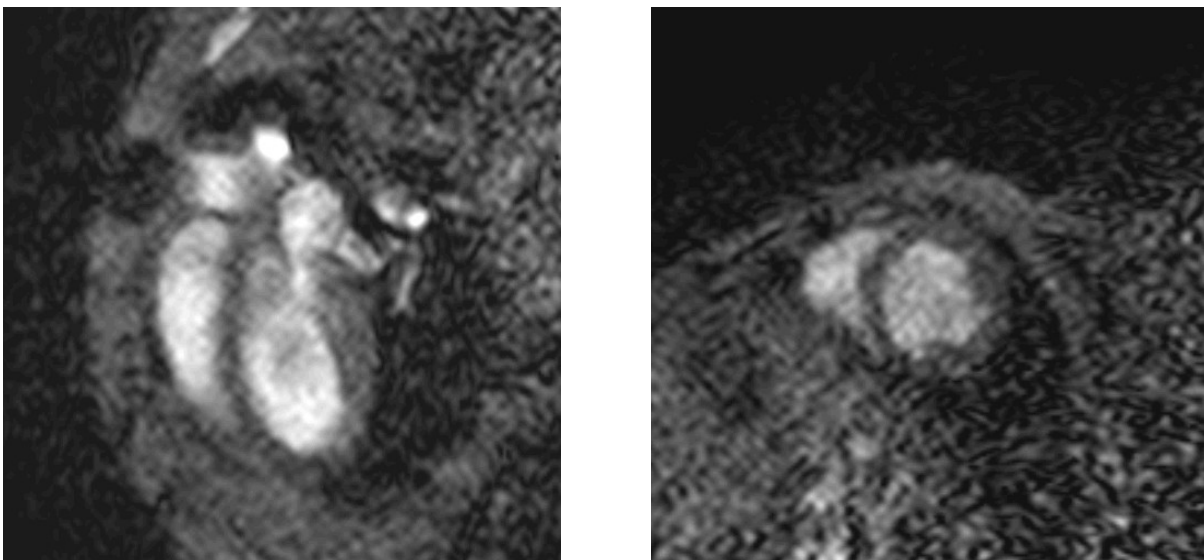


Abbildung 11: kardiales MRT einer gesunden Maus (links: lange Achse und rechts: kurze Achse)

## 2. Material und Methoden

Die Basis für den Bildkontrast im MRT ist die unterschiedliche Suszeptibilität (= Empfänglichkeit) der verschiedenen Gewebestrukturen. Die Signalstärke der Volumeneinheiten wird in Grauwerten kodiert abgebildet. Da diese von allen beteiligten Parametern abhängen, gibt es beim MRT keine Normwerte (im Gegensatz zum CT, das die Hounsfield-Units als Bewertungsskala benützt). Die Bildinterpretation beim Kernspinverfahren stützt sich auf den Gesamtkontrast und ist abhängig von der gewählten Pulssequenz und Wichtung (T1, T2).

Die Pulssequenz ist eine für die Fragestellung der Untersuchung speziell ausgesuchte Einstellung von Amplitude, Zeitdauer und -punkt der Hochfrequenz- und Gradientenimpulsen während des Scans. In unserem Studiendesign wurde die gespoilte Gradientenechosequenz verwendet, die sich neben der Beurteilung der Anatomie und Funktionalität des Herzens auch zur Narbendarstellung eignet. Um zum einen Artefakte durch die Herzbewegungen und den Blutfluss zu vermeiden und zum anderen die Herzaktionen den unterschiedlichen Herzphasen zuordnen zu können, wandten wir die Technik der prospektiven und retrospektiven EKG-Triggerung an. Der Trigger-Punkt war in beiden Fällen die R-Zacke im EKG. Gerade die retrospektive Triggerung eignet sich zur Beurteilung der Volumetrie, da sie neben dem gesamten RR-Intervall auch die zugehörigen Herzphasen zu erfasst.

### ***2.2.2.2 Ablauf der Messung***

Um das MRT durchführen zu können, wurde das Tier mit Hilfe von Medetomidin (0,5mg/kg) + Midazolam (5mg/kg) + Fentanyl (0,05mg/kg) intraperitoneal narkotisiert. Sobald die Maus schlief, wurde ihr ein Kleintier-EKG (1025-MR-Einheit) angebracht und das Tier auf dem Bauch gelagert, wobei der Thorax direkt über der Mikro-Einzelspule (Durchmesser = 2,3mm) zu liegen kam. Anschließend wurde die Maus auf der Spule fixiert. Um während des laufenden Scans eine ausreichende Atmung zu gewährleisten, erhielt das Tier Sauerstoff über eine Maske. Nach Beendigung der Messung wurde die Maus mit Atipamezol (3,57mg/kg) + Flumazenil (0,714mg/kg) + Naloxon (1,7mg/kg) antagonisiert, zurück in ihren Käfig gelegt und konnte dann dem weiteren Versuchsverlauf zugeführt werden.

Eingeschlossene Parameter während der Messung: Repetitionszeit/Echozeit (= TR/TE) 18ms/6,5ms, Flipwinkel = 30°, Averages = 1, Sichtfeld (= field of view, FOV) = 35mm, Matrix = 128. Dies ergab eine räumliche Auflösung von 0,22x0,22x1mm und zeitliche Auflösung von 18ms. Die Aufnahme erfolgte im Cine-Modus, der eine visuelle Auswertung sowohl von Einzelbildern, als auch

## 2. Material und Methoden

Bildsequenzen ermöglicht. Die Einstellungen wurden modifiziert, basierend auf den Erkenntnissen von Keithahn et al. [141].

Alle Messungen wurden mit einem 1,5T Philips Achievea MR Scanner, der das klinische Gradientensystem 30mT/m, 150mT/m/ms nutzte, durchgeführt. Die Parameter wurden durch die zugehörige kardiale Software (R1.2.2) erfasst.

### **2.2.2.2.3 Auswertung**

Die Herzen wurden im Kurzachsenschnitt und Kurzachsenstapel (7 Schichten) betrachtet. Das Auswertungsprogramm (IDL 6.1) erfasst die endsystolischen und enddiastolischen Konturen der Ventrikel in allen Schnitten und erfasst folgende Volumen:

1. Enddiastolisches Volumen (EDV in ml)
2. Endsystolisches Volumen (ESV in ml)
3. Schlagvolumen (SV, in ml)

Aus diesen Werten errechnet das Programm die für diese Arbeit entscheidende Ejektionsfraktion nach der Formel:

$$SV/EDV \times 100 = EF \text{ in } \%$$

Neben der Bewertung der Volumenverhältnisse war anhand der Bilder auch eine visuelle Beurteilung der Herzen möglich. Die Herzen wurden hinsichtlich ihrer Morphologie und auf Störungen in der Pumpfunktion betrachtet. Besonders geachtet wurde auf die Ventrikelarchitektur und auf hypo-, dys- oder akinetische Myokardanteile während des gesamten Herzzyklus.

## 2. Material und Methoden

### **2.2.3. Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)**

#### **2.2.3.1. Grundprinzip und Messung der Proben**

Zur Analyse der Stammzellpopulationen in Blut, Knochenmark und Herz wurde die 3-Farben-Durchflusszytometrie durchgeführt. Sie dient der Klassifizierung von Zellen anhand ihrer Größe, Granularität und Oberflächenproteine. Um eine Zelle letztendlich genau zu charakterisieren werden mehrere Oberflächenproteine mittels Antigen-Antikörper-Reaktion bestimmt. Die zu untersuchenden Proben werden mit monoklonalen fluoreszenzmarkierten Antikörpern auf verschiedene Stammzellmarker (siehe 2.2.3.2.2) gefärbt. Durch die unterschiedlichen Emissionsspektren der Farbstoffe kann man die einzelnen an der Zelloberfläche exprimierten Antigene unterscheiden und zu ordnen.

In diesem Projekt wurden als Farbstoffe Fluorescein-Isothiocyanat (FITC, 515-545nm), Peridinin Chlorophyll-A-Protein (PerCP,  $\geq 650\text{nm}$ ) und Phycoerythrin (PE, 564-606nm) verwendet. Dabei bildet der FITC-gelabelte-Antikörper CD34<sup>+</sup>, der PerCP-gelabelte-Antikörper CD45<sup>+</sup> und der PE-gelabelte Antikörper CD31<sup>+</sup> oder VLA-4<sup>+</sup> ab.

Mit Hilfe dieses Prinzips sind eine qualitative und quantitative Unterscheidung und der Vergleich der einzelnen Zellpopulationen möglich. Bei jeder Analyse wurde als repräsentative Auswahl 50.000 Events gemessen.

Nach dem Einspannen der Probenröhrchen (Vorbereitung siehe 2.2.3.2) wird die Suspension mit hoher Geschwindigkeit durch eine Stahlkapillare eingesaugt und somit ein laminarer Hüllstrom erzeugt. Beim Eintritt in die Messkammer werden die Zellen weiter beschleunigt, so dass sie den Analysepunkt einzeln hintereinander erreichen. Diesen Prozess nennt man hydrodynamische Fokussierung.

Mit einem Argonlaserstrahl der Wellenlänge 488nm werden die Zellen erfasst. Durch die so entstehende Lichtstreuung können neben den verschiedenen Fluoreszenzen (s.o.) auch die Kerngröße und Granularität gemessen werden. Die Größe wird über das vorwärts gestreute Licht (forward scatter) und die Granularität über das rechtwinklig zum einfallenden Lichtstrahl gestreute Licht (sideward scatter) erfasst. Diese beiden Parameter erlauben bereits den Rückschluss auf die Identität einzelner Zellpopulationen. Anhand dieser Einflussgrößen wurde zunächst der Lymphozytenanteil heraus sortiert. Bei dem anschließenden „Gaten“ nützte man die unterschiedlichen Fluoreszenzspektren der Antikörper. Wenn die markierten Zellen durch den monochromatischen Laserstrahl angeregt werden, erreichen sie vorübergehend ein höheres

## 2. Material und Methoden

Energieniveau und kehren dann zu ihrem ursprünglichen Ausgangswert zurück. Die dabei frei werdende Emissionsrate wird in einem Photodetektor gemessen und verhält sich proportional zur Menge der gebundenen Antikörper und somit der auf der Zelle vorhandenen Oberflächenmerkmale. Da sich die Spektren teilweise überlappen oder eng zusammen liegen, wird vor Beginn jeder Probenreihe eine Isotypen-Kontrolle durchgeführt. Isotypen sind unspezifisch bindende Antikörper der jeweiligen Farbe. Dadurch wird die Signalverstärkung der einzelnen Kanäle so geeicht, dass sich die Zellen exakt trennen lassen. Nun können die Zellen während der Analyse solange selektioniert werden bis jede in der Abbildung 12 auftretende Zelle alle drei Merkmale ( $CD45^+$ / $CD34^+$ /spezieller  $AK^+$ ) besitzt und somit der gesuchten Stammzellpopulation entspricht.

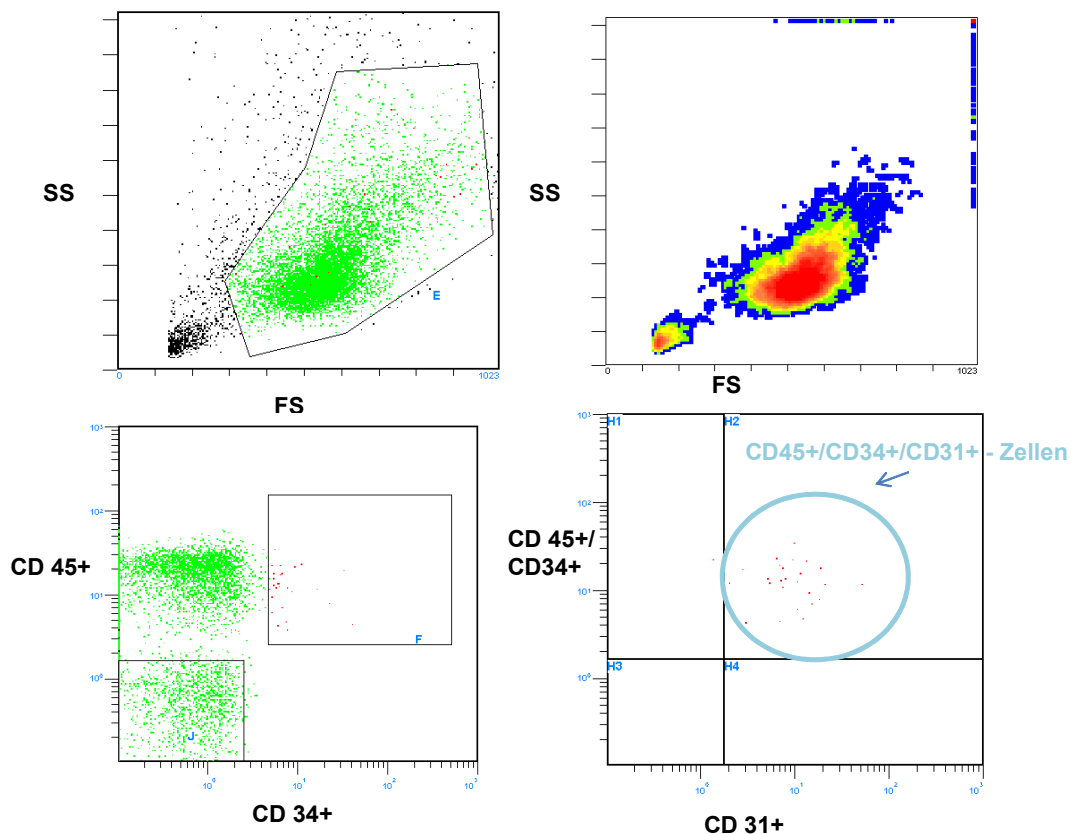


Abbildung 12: FACS-Analyse einer gesunden Kontrolle (peripheres Blut)

Zur Messung wurden das FACS (Analysegerät) Coulter Epics XL-MCL und die dazugehörige Software EXPO32 ADC XL 4 Color verwendet. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm EXPO32 ADC (alles von Beckman Coulter).



## 2. Material und Methoden

### **2.2.3.2. Materialgewinnung und -aufbereitung**

#### ***2.2.3.2.1 Blutentnahme und Knochenmarkgewinnung***

Zu diesem Zweck wurde das Versuchstier wie unter 2.2.1.2. beschrieben aus dem Käfig entnommen, narkotisiert und gelagert. Ähnlich der Intubation wurde ein Schnitt seitlich der Trachea gesetzt, die Muskulatur getrennt, das Gefäß grob frei präpariert und mit einer kleinen Operationsschere gekappt. Mit Hilfe einer Spritze, die zu Vermeidung der Blutgerinnung mit 155µl Heparin vorbefüllt war, wurde das entströmende Blut aufgefangen, vorsichtig geschwenkt und in ein Eppendorfcup gegeben.

Im Anschluss wurde das Tier mittels Überdosis i.p. getötet und der Maus wurden beide Schienbeine und Oberschenkelknochen entfernt. Die heraus gelösten Knochen wurden sorgfältig mit PBS von überschüssigem Muskelgewebe gereinigt. Die Knochen wurden einzeln, jeweils mit frischen Kanüle, durchgespült (4ml PBS/ pro Knochen), um das Knochenmark herauszulösen. Das gewonnene Material wurde mittels Pipette suspendiert.

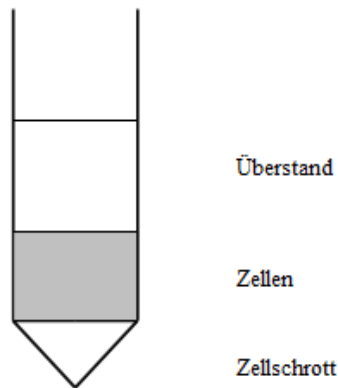
Nun wurde wiederum der Thorax eröffnet und das Herz zu weiteren Analyseschritten, Histologie, Real-Time-PCR und ELISA, entnommen.

#### ***2.2.3.2.2 Aufbereitung der Materialien***

In Zentrifugenröhrchen wurde bereits die entsprechende Menge an Histopaque vorgelegt, für Blut 1ml und Knochenmark 4 ml. Das Blut und die Knochenmarklösung wurden nun vorsichtig darüber geschichtet. Eine Vermischung der beiden Phasen sollte vermieden werden, da sonst eine sorgfältige Aufteilung in die Bestandteile nicht mehr gewährleistet ist.

Anschließend folgte der erste Zentrifugenschritt (Bremse 1, 1100rpm, 30 min) zur Zelltrennung. Das Ergebnis zeigt Abbildung 13.

## 2. Material und Methoden



*Abbildung 13: Röhrchen nach dem ersten Rotationsschritt*

Die mittlere Phase mit den Zielzellen (= mononukleäre Zellen) wurde in ein frisches Röhrchen überführt und die Probe mit PBS auf 6ml verdünnt. Es schloss sich ein erneuter Zentrifugationsschritt (Bremse 3, 800rpm, 10 min) an. Nach Beendigung der Rotation war ein Pellet entstanden. Der Überstand wurde abgossen, das Pellet mit 6ml PBS-BSA2% (= 49 ml PBS + 1 g BSA-Pulver) erneut gelöst und mit den gleichen Einstellungen geschleudert. Dieser Schritt wurde anschließend wiederholt. Nach dem letzten Schleudergang wurde das Pellet mit 300µl PBS-BSA2% resuspendiert. Die Zugabe von BSA verhindert unspezifische Proteinbindungen.

In der Zwischenzeit wurden Eppendorf-Cups zur Inkubation vorbereitet. Die Isokontroll-Tubes wurden jeweils mit 20µl PBS-BSA2%, 10µl Isotype Control A-PE, 10µl Isotype Control-FITC, 10µl Isotype Control-PerCp vorbereitet. Die Proben-Tubes wurden dagegen mit 30µl PBS-BSA 2%, 10µl des spezifischen PE gelabelten Antikörper, 10µl CD 45, 1µl CD34 gefüllt. In jedes Eppendorfcup wurden 50µl der Blut- oder Knochenmarkprobe hinzugegeben (siehe Abbildung 14). Nach kurzem Rütteln der Cups folgte eine Inkubationszeit von 60 Minuten bei 4°C.

Zu beachten war bei allen Schritten die Antikörper betrafen, soweit als möglich im Dunkeln zu arbeiten, da Antikörper lichtinstabil sind. Weiterhin sollten alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt werden, um vorzeitige Reaktionen zu vermeiden.

## 2. Material und Methoden

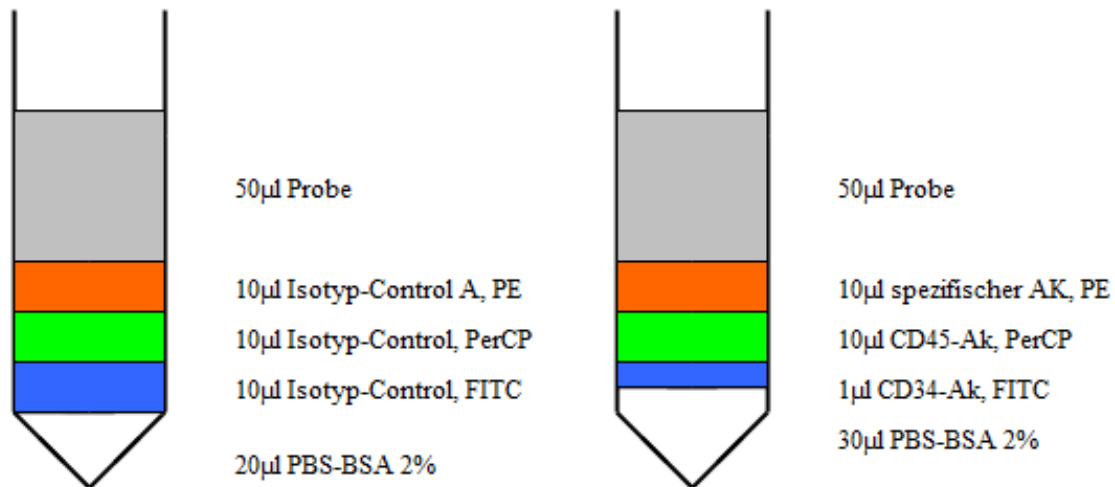


Abbildung 14: schematische Darstellung der Befüllung der Eppendorf-Cups

Nach der Einwirkzeit wurden zwei weitere Reinigungsschritte mithilfe von PBS-BSA 2% durchgeführt. Dazu wurden jeweils 200µl PBS-BSA 2% zugegeben und zentrifugiert (2000rpm, 5 min). In der Zwischenzeit wurden spezielle FACS-Röhrchen mit PBS-BSA2%, 800µl für Knochenmarkanalysen und 400µl für die Blutanalysen, vorbereitet. Die letztendlich entstandenen Pellets wurden mit 100µl PBS-BSA2% gelöst, in die FACS-Röhrchen überführt, gut vermischt und der Messung zugeführt.

### **2.2.3.2.3 Probenherstellung für das kardiale FACS**

Dem euthanisierten Tier wurde das Herz entnommen. Bei dem Herauspräparieren des Herzens war darauf zu achten, die Aorta lang genug mitzunehmen, da das entnommene Herz retrograd mit NaCl 0,9% gespült wurde, um es vollständig von Blut zu entleeren. Die vollkommene Blutleere war besonders wichtig, da das Ergebnis der Analyse ansonsten verfälscht werden könnte. Nach der Spülung wurde das Herz in eine frische Zellkulturschale umgelagert und mit einem sterilen Skalpell in Stücke geschnitten. Der Probe wurden daraufhin 6ml Collagenase-IV-Lösung zupipettiert und nach leichtem Schwenken zum Verdau im Zellschrank ruhen gelassen (30min, 37°C). Nach dieser

## 2. Material und Methoden

Zeit wurde die Probe gründlich resuspendiert, dann mittels einem 70µm Zellsieb gefiltert und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Weitere 6ml PBS wurden der Lösung zugegeben und es folgte eine Zentrifugation (800rpm, 10min). Dieser Arbeitsschritt wurde im Anschluss noch zweimal wiederholt. Nach dem dritten Schleudern wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und das verbliebene Pellet mit 230µl PBS-BSA2% gelöst und anschließend jedes neu vorbereitete Eppendorfcup mit 50µl der Probe bestückt.

Die Cups waren während der Rotationsvorgänge bereits mit den einzelnen Komponenten vorbefüllt worden. In Tabelle 4 findet sich eine Aufstellung der einzelnen Bestandteile.

	<b>CD31</b>	<b>VLA-4</b>		<b>Iso A (Kontrolle)</b>
<b>PBS-BSA2%</b>	30µl	30µl	<b>PBS-BSA2%</b>	20µl
<b>CD45-PerCP</b>	10µl	10µl	<b>Iso A-PerCP</b>	10µl
<b>CD 34-FITC</b>	1µl	1µl	<b>Iso A-FITC</b>	10µl
<b>CD 31-PE</b>	10µl		<b>Iso A-PE</b>	10µl
<b>VLA-4-PE</b>		10µl		
<b>Probe</b>	50µl	50µl		50µl

*Tabelle 4: Übersicht über die einzelnen Bestandteile der Antikörperfärbungen auf die CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>-Zellen im kardialen FACS*

Um die residenten kardialen Stammzellen (CD45<sup>-</sup>/CD34<sup>-</sup>/Sca-1<sup>+</sup> und CD45<sup>-</sup>/CD34<sup>-</sup>/c-Kit<sup>+</sup>) zu erfassen, denen die Oberflächenmarker CD45 und CD34 fehlen, mussten die Eppendorfcups mit anderen Antikörpern bestückt werden. Tabelle 5 zeigt diese. Bevor die letzten Aufbereitungsschritte der murinen Proben wieder gemeinsam liefen, wurde die fertig bestückten Cups 40 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

## 2. Material und Methoden

<b>PBS+BSA 2%</b>	34µl
<b>CD3e</b>	1µl
<b>CD45R/B220</b>	1µl
<b>Gr-1</b>	1µl
<b>Mac-1</b>	1µl
<b>TER-119</b>	1µl
<b>Sca-1-FITC</b>	1µl
<b>c-kit-PE</b>	10µl
<b>Streptavidin-PerCP</b>	10µl
<b>Probe</b>	50µl

*Tabelle 5: Befüllung des Eppendorfcups um die CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>-</sup> Subpopulation SCA-1<sup>+</sup> und c-Kit<sup>+</sup> zu analysieren*

Analog zu den Proben von Blut und Knochenmark folgten der eigentlichen Färbung nochmals zwei Waschgänge. Als erstes wurde in jedes Röhrchen erneut 200µl PBS-BSA2% zugeben und zentrifugiert (5min, 2000rpm, Raumtemperatur). Im Anschluss wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert, das verbliebene Pellet wieder in 200µl PBS-BSA2% gelöst und mit den gleichen Einstellungen erneut geschleudert. Nach dem Rotieren wurden die 200µl PBS-BSA2% wieder abgezogen und das Pellet ein letztes mal in 100µl PBS-BSA2% resuspendiert. Die fertige Lösung wurde in vorbereitete FACS-Röhrchen (= befüllt mit 400µl PBS-BSA2%) überführt, gut vermischt und sofort der Messung zugeführt.

### **2.2.4. Histologie und Immunhistologie**

Histologie und Immunhistochemie der Herzen sind in Kooperation mit Frau Prof. Dr. Klingel, Institut für molekulare Pathologie des Universitätsklinikums der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, durchgeführt worden.

## 2. Material und Methoden

### **2.2.4.1 Histopathologie mittels HE- und Trichromfärbung**

Nach dem Tod des Tieres wurde der Thorax eröffnet, das Herz an den Gefäßstielen gelöst und entnommen. Über die großen Gefäße wurde das Herz retrograd mit NaCl 0,9% gespült, um die intrakardiale Blutmenge zu entfernen. Im Anschluss wurde mit einem sterilen Skalpell ein 2mm dicker Querschnitt durch beide Ventrikel entnommen.

Nach einer 24stündigen Fixierung in 4% Formalin (bei 4°C aufbewahrt) wurden die Proben in PBS umgelagert und nach Tübingen zur weiteren Aufbereitung und Analyse versandt. Dort wurden die Gewebeschnitte in Paraffin eingebettet und mit einem Mikrotom in 5µm dicke Scheiben geschnitten. Nach Streckung und Glättung der Proben im Warmwasserbad wurden die Schnitte auf saubere, silanisierte Objektträger aufgezogen und 24 Stunden bei 37°C getrocknet.

Zunächst wurden die Präparate mit Masson-Trichrom bzw. mit Hämatoxylin/Eosin (HE) nach Standardverfahren gefärbt. Dadurch konnte nicht nur die virusinduzierte DCM gesichert werden, sondern durch diesen Schritt gelang es auch die Werte der anderen Untersuchungen mit dem Grad der Inflammation zu vergleichen und in Relation zu setzen.

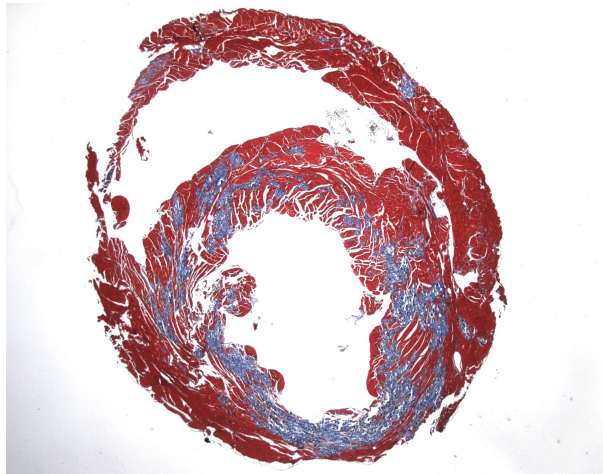
Die Schnittbilder wurden in verschiedenen Vergrößerungen (1,25-, 2,5-, 5-, 10- und 20fach) begutachtet und nach Eriksson et. al. [142] wurde das Ausmaß der kardialen Entzündungsreaktion (siehe untenstehenden Tabelle 6) klassifiziert.

	<b>Ausschlaggebende Parameter:</b>
Grad 0	Keine entzündlichen Infiltrate im Präparat nachweisbar
Grad 1	Kleine Fokusse von entzündlichen Zellen zwischen den Myozyten
Grad 2	Größere Fokussen ( $\geq 100$ entzündliche Zellen) zwischen den Myozyten
Grad 3	Entzündliche Infiltrate $\leq 10\%$ des gesamten Schnittbildes
Grad 4	Entzündliche Infiltrate 10-30% des gesamten Schnittbildes

*Tabelle 6: Einteilung der DCMi nach dem Entzündungsgrad nach Eriksson [142]*

## 2. Material und Methoden

Beurteilt wurden weiterhin die Ventrikelarchitektur und das Remodelling. Gerade die Masson-Trichrom-Färbung ist besonders geeignet zur Darstellung von bindegewebigen Strukturen. Sie gab Aufschluss über die Ausdehnung der fibrotischen Umwandlung und Verkalkungen. In der Abbildung 15 sieht man beispielhaft wie die Umwandlung von Herzmuskelzellen in Kollagen durch die intensive Blaufärbung deutlich wird.



*Abbildung 15: fibrotische Herde (blau) in der Masson-Trichromfärbung bei einer Maus mit postinfektiöser DCM*

### **2.2.4.2 Immunhistochemie**

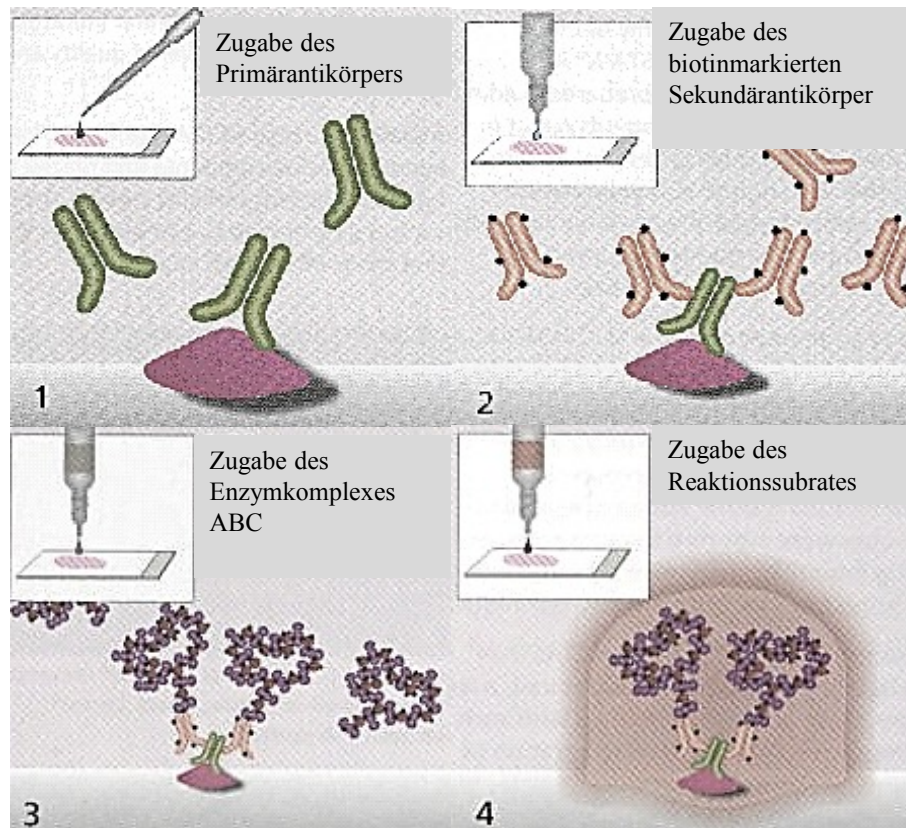
Zur immunhistochemischen Färbung der Schnitte wurde die Streptavidin-Biotin-Immunoperoxidase-Methode von Vectastain (Vectastain EliteABC) eingesetzt.

Zunächst wurden, wie unter 2.2.4.1 beschrieben, Paraffinschnitte erstellt. Diese wurden mit Xylol wieder entparaffinisiert und anschließend für 5 Minuten gewässert. Als nächstes wurde die endogene Peroxidase mittels 7,5%igen Wasserstoffperoxid inaktiviert. Es folgten weitere Spülungen in Aqua dest. und TRIS. Jetzt konnten die Schnitte mit den Primärantikörpern, Caspase-3 und VCAM-1, inkubiert werden (Raumtemperatur, 60 Minuten). Um die gewünschten Antigene später sichtbar machen zu können wurden mehrere Arbeitsschritte durchgeführt. Zunächst wurden in die Proben in Zitratpuffer erhitzt (10mmol/l, pH 6.0, 4 min, 120°C) und anschließend mit einem Sekundärantikörper erneut bebrütet (Raumtemperatur, 30 Minuten). Dieser Zweitantikörper besitzt als Eigenschaften, dass er mit Biotin markiert gegen die Spezies des Erstantikörpers gerichtet und

## 2. Material und Methoden

an einen Komplex aus Streptavidin und biotinylierter Immunperoxidase gebunden ist. Durch die Reaktion der Peroxidase mit Histogrün als Träger entsteht die spezifische Farbreaktion. Zur Beendigung der Färbung wurden die Gewebestücke mit Hämatoxylin benetzt. Einen kurzen Überblick gibt Abbildung 16 in Anlehnung an die Produktvorstellung von Vectastain [7].

Als Negativkontrollen dienten bei diesem Versuch arten- und isotypen-abgestimmte IgG-Antikörper, die an Stelle der Primärantikörper aufgetragen wurden.



*Abbildung 16: Färbungsprinzip der Immunhistologie: oben links: Aufbringung des Primärantikörpers, oben rechts: Auftragung des Sekundärantikörpers, unten links: Zugabe des ABC-Komplexes und unten rechts: Enzymzugabe [7].*

Die Auswertung erfolgte unter dem Mikroskop (Zeiss Axioskop 40). Gezählt wurden pro Schnitt vier Gesichtsfelder und die positiven Zellen wurden als Prozentsatz des Gesamtgewebes angegeben.



## 2. Material und Methoden

### **2.2.4.2.1 VCAM-1**

VCAM-1 wird auf Endothelzellen exprimiert. Bekannt ist seine Funktion Leukozyten in entzündetes Gewebe zu rekrutieren. In der Embryonalzeit scheint es außerdem an der Entwicklung der Plazenta und des Herzens beteiligt zu sein [143]. Weiterhin zählt VCAM-1 zu den myokardialen Homingfaktoren. Es stellt den korrespondierenden Ligand von VLA-4 dar und kann somit die Migration von adulten Stammzellen in das Myokard ermöglichen [71]/[3]. Da wir aufgrund der positiven Real-Time PCR-Daten dieser Arbeit einen möglichen Homingweg über die VCAM-1/VLA-4 vermuteten [9], führten wir die Immunhistologie bei infizierten und nicht infizierten Mäusen (je n=7) durch.

### **2.2.4.2.2 Caspase-3**

Die Caspase-3 gehört zu der Caspasenfamilie (engl: **cysteiny**l-**aspartate specific protease**) und zeigt die ablaufende Apoptose einer Zelle an. Besonders aussagekräftig ist die Caspase-3 u.a. weil sie sowohl über den intrinsischen als auch den extrinsischen Weg aktiviert wird [144-145]. Somit bietet sich die Färbung auf Caspase-3 besonders gut an, um den antiapoptotischen Einfluss von G-CSF zu erforschen.

Die Untersuchung wurde vor der G-CSF-Gabe und auch nach der erfolgten Therapie durchgeführt und die Ergebnisse gegenübergestellt.

## **2.2.5. Real-Time-PCR**

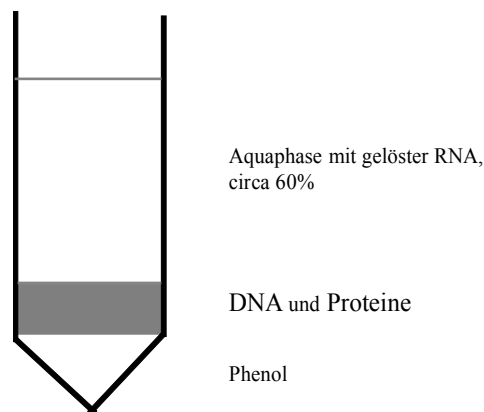
Um nachzuvollziehen, über welchen Weg sich die Stammzellen bei der virusinduzierten DCM am Herz anlagerten, analysierten wir die Herzen der Mäuse auf unterschiedliche myokardiale Homingfaktoren (SDF-1, SCF, P-Selectin, ICAM und VCAM-1) mit Hilfe der quantitativen Real Time PCR. Dazu musste zunächst cDNA generiert werden.

## 2. Material und Methoden

### **2.2.5.1. Gewinnung der cDNA**

Die Gewinnung der cDNA verläuft über zwei Schritte. Im ersten wird die RNA aus dem Herzgewebe isoliert und gereinigt, um dann im zweiten Schritt in cDNA umgeschrieben werden zu können.

Das entnommene Herz wurde zunächst gewogen und in eine Lösung gegeben (Tri-Reagent 1ml/100mg Gewebe). Jetzt wurde das Herz solange gehexelt, bis es sich komplett gelöst hatte. Nach kurzem Warten (5 Minuten, Raumtemperatur) wurde die Suspension mit Chloroform verdünnt (200µl/1ml TriReagent), mittels Top/Bottom-Technik vermischt und dann zentrifugiert (15 Minuten, 13.000rpm, 4°C). Nach diesem Schritt waren im Eppendorfcup drei Phasen sichtbar (Abbildung 17): 1. Aquaphase mit gelöster RNA (circa 60%), 2. DNA und Proteine und 3. Phenol.



*Abbildung 17: schematische Darstellung des Röhrchens nach dem ersten Fällungsschritt*

Die Wasserphase wurde in ein neues Eppendorfcup überführt und mit Isopropanol (500µl/1ml Ausgangsmenge) gemischt. Nach 10minütiger Ruhephase (Raumtemperatur) wurde erneut geschleudert (10Minuten, 13.000rpm, 4°C). Am Ende dieser Rotation war in der Spitze des Cups ein Pellet aus gefällter RNA entstanden. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1ml 75% Ethanol gelöst und wiederum zentrifugiert (8 Minuten, 10.000rpm, 4°C). Nach diesem Waschschrift wurde die Flüssigkeit erneut abgegossen und das Pellet getrocknet (Raumtemperatur). Nach dem Trocknen der RNA wurde diese in 100µl RNasefree water resuspendiert und der DNase-Verdau (DNase-Verdau Kit der Firma Invitrogen) durchgeführt. Dafür wurden der Lösung Puffer und DNase I (je12µl) zugegeben und 15 Minuten inkubiert (Raumtemperatur). Als letztes wurde EDTA (12µl) hinzu pipettiert, erneut vermischt und das Cup in den Wärmeblock (10Minuten, 65°C)

## 2. Material und Methoden

gegeben.

Für die cDNA-Synthese wurden in der Zwischenzeit neue Eppendorfcups vorbereitet. Dazu wurde jedes Cup nacheinander mit dem Omniskript RT-Kit-Bestandteilen bestückt und als letztes Element wurden 4µl der gewonnenen RNA zugefügt (siehe Tabelle 7). Diese Lösung wurde im Anschluss bebrütet (60 Minuten, 37°C), denaturiert (5 Minuten, 93°C), die nun fertige cDNA mit 20µl RNasefree water verdünnt und der Real-Time-PCR zugeführt. Bei Pausen in der Herstellung oder zur Aufbewahrung wurden die Proben bei –80°C eingefroren.

Elemente	Menge
RNasefree water	10,75µl
Puffer	2µl
dNTP5mM	2µl
Random Primer-Verdünnung	2µl
Omniscript	1µl
RNase-Inhibitor	0,25µl
Individuelle RNA-Probe	4µl

*Tabelle 7: Einzelkomponenten des Eppendorfcups für die cDNA-Synthese*

### **2.2.5.2. Grundprinzip und Durchführung der Real Time PCR**

Die quantitative Real Time PCR (RT-PCR) beruht auf dem Prinzip der normalen Polymerase-Kettenreaktion (siehe unten) und ist somit ein Verfahren zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren. Zusätzlich kann durch fluoreszierende Verfahren eine Quantifizierung des entstandenen Produkts während beziehungsweise am Ende eines PCR-Zyklus vorgenommen werden (= Real Time). Zur Quantifizierung der DNA können verschiedene Methoden zum Einsatz gebracht werden. In diesem Versuch wurde mit SYBR-Green gearbeitet. SYBR-Green ist ein fluoreszierender Farbstoff, der sich in die DNA einlagert (= interkalierender Farbstoff). Dieser bindet unter Änderung seines Fluoreszenzspektrums und diese Abweichung vom Ausgangswert kann gemessen werden. Das Ansteigen der Fluoreszenz korreliert mit der Zunahme des PCR-Produktes. Zunächst muss ein spezifischer Schwellenwert, auch „threshold“ genannt, festgelegt werden. An diesem überschreitet

## 2. Material und Methoden

die Fluoreszenzintensität deutlich die Hintergrundfluoreszenz des ungebundenen Farbstoffes. Der „threshold cycle“, oder kurz Ct, entspricht dem Zyklus, in welchem die einzelne Probe diesen Punkt überschreitet. Die relative Quantifizierung einer Probe entspricht somit der Differenz zwischen dem gesuchten Gen und der internen Kontrolle (siehe unten) am Schwellenwert ( $= \Delta Ct$ ):

$$\Delta Ct = Target - interne\ Kontrolle$$

Interne Kontrolle: Schwellenwert H4 (= Housekeeping-Gen)

Target: gesuchtes Gen

Die RT-PCR wurde mit dem iQ SYBR Green Supermix Kit (BioRad) durchgeführt. Der Reaktionsansatz umfasste neben der individuellen DNA zwei verschiedene Primer (1. Vergleichsprimer und 2. gesuchter Primer), iQ SYBR Green Supermix und steriles Wasser.

Der Vergleichsprimer ist das sogenannte Housekeeping-Gen, zu welchem alle anderen ins Verhältnis gesetzt werden. Housekeeping-Gen sind definitionsgemäß Proteine, welche an zentralen Prozessen beteiligt sind, in großen Mengen vorliegen und durch ein Experiment nicht beeinflusst werden sollen. Das verwendete Haushaltsgen bei Mäusen ist das Histon H4.

SDF-1, SCF, P-Selectin, ICAM und VCAM-1 wurden als gesuchte Primer den Proben zugegeben (je einer/Ansatz). Die verwendeten Primersequenzen finden sich in Tabelle 8.

## 2. Material und Methoden

mSDF-1 a-up36	5' -GAG CCA ACG TCA AGC ATC TG- 3'
mSDF-1a-lo131	5' -CAA TGC ACA CTT GTC TGT TG- 3'
mSCF-up76	5' -CCT CTT GTC AAA ACC AAG GAG- 3'
mSCF-lo356	5' -CAT AAC ACG AGG TCA TCC AC- 3'
mVCAM-up32	5' - CCT CAA CGG TAC TTT GGA TAC- 3'
mVCAM-lo299	5' -CCA CAT GTT GCT GTG CAC AG- 3'
mICAM-up84	5' -GGT ATC CAT CCA TCC CAG AG- 3'
mICAM-lo343	5' -CAC TCT CCG GAA ACG AAT AC- 3'
mP-Selectin-up62	5' -CTC AAC TCA TCT GGT TCA GTG- 3'
mP-Selectin-lo337	5' -CCT CCG TGA GTG TCT TAT TTG- 3'
H4 up	5' -GTT CTC CGC GAT AAC ATC C- 3'
H4 lo	5 -CAG GAA CAC CTT CAG CAC AC- 3'

*Tabelle 8: verwendete Primersequenzen der gesuchten myokardialen Homingfaktoren in der Real-Time-PCR*

Die Primer lagern sich während der PCR der DNA an, Hybridisierung oder auch Annealing genannt. Um die Anlagerung zu ermöglichen, müssen die DNA und die Primer einzelsträngig vorliegen. Deshalb wurde die Probe in jedem Durchlauf initial auf 95°C (30 Sek) erhitzt (= Denaturierung). Nun konnten sich die einzelsträngigen Primer komplementär an die entsprechende DNA-Zielsequenz binden. Es folgte ein Abkühlen auf die entsprechende Annealing-Temperatur (30 Sek). Die genaue Temperatur wird hierbei durch die Länge und die Sequenz der Primer bestimmt. Als letztes durchlief der Ansatz die Elongation (10 Sekunden, 72°C). Hierbei füllt die DNA-Polymerase, i TAG DNAPolymerase (iQ SYBR Green Supermix Kit), die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden auf.

Eine Messung umfasst 40 Zyklen. Nach dem letzten Lauf wurde der Reaktionsansatz automatisch abgekühlt.

Die Probe wurde mit Agarosegel (1%), Ethidiumbromid ( 20 µl) und dem Auftragspuffer für die Elektrophorese in eine Gelkammer gegeben. Eine Spannung von 120 Volt wurde für 45 Minuten so angelegt, dass die Banden vom Minus- zum Pluspol wanderten. Bei jeder Probe wurden die Banden von H4 (interne Kontrolle), Negativkontrolle und 100bp-DNA-Leiter mitaufgezeichnet. Mittels UV-

## 2. Material und Methoden

Licht, der Fluoreszenz-Kamera (Gel Doc 2000, BioRad) und dem Programm „Quantity One“ (BioRad) wurden die Banden aufgenommen.

### **2.2.6 Enzyme-linked immuno sorbent assay (= ELISA)**

#### **2.2.6.1 Grundprinzip des ELISA**

Nach den Erkenntnissen der RT-PCR-Untersuchungen wurde VCAM-1 mittels ELISA genauer bestimmt, weil mittels ELISA das fertige Proteinprodukt selbst quantifiziert werden kann. Dies geschieht mit Hilfe einer an ein immunologisches Nachweisverfahren gekoppelten Farbreaktion. Zur Anwendung kam in unserem Versuch das Sandwich-ELISA-Verfahren, schematisch dargestellt in Abbildung 18. Dabei binden zwei Antikörper das spezifische Maus-Antigen VCAM-1. Der erste fixiert das gesuchte Protein und der zweite zeigt es über eine Farbreaktion an. Die Intensität der Farbe korreliert mit der gebundenen Menge von VCAM-1 und der genaue Wert kann an einer mitgelaufenen Standardkurve abgelesen werden.

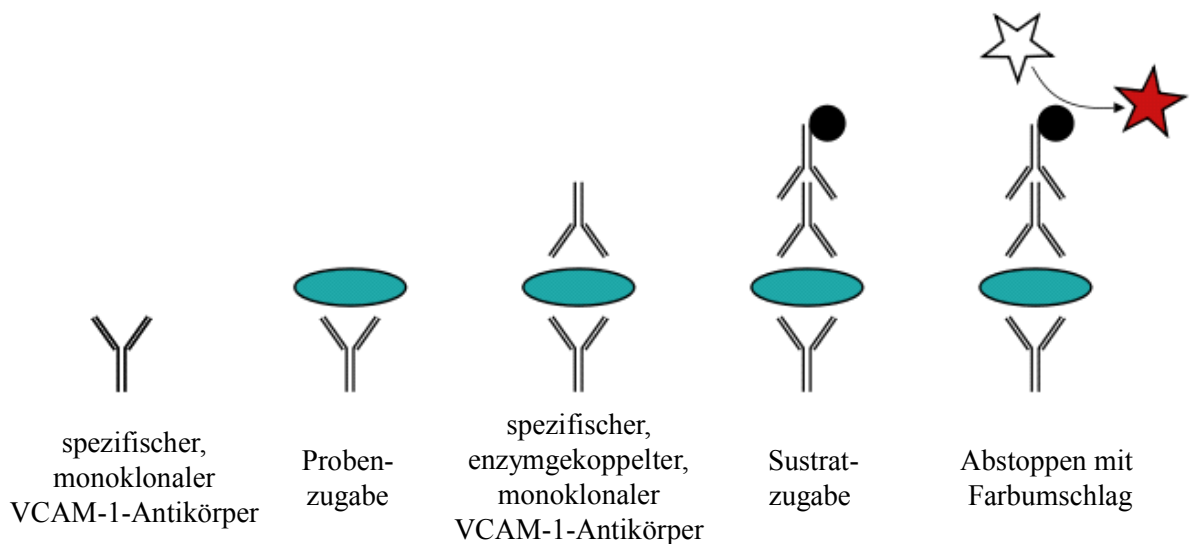


Abbildung 18: Funktionsprinzip des ELISA-Verfahrens modifiziert nach [8]

## 2. Material und Methoden

### **2.2.6.2 Probenaufbereitung und Auswertung**

Zunächst wurden die entnommenen Herzen in einer 0,1% Kollagenasenlösung (45 Minuten) verdaut und anschließend im Ultraschallhomogenisator gehexelt. In der Zwischenzeit erwärmten alle Reagenzien des Mouse sVCAM-1/CD106 Quantikine (R & D Systems) auf Zimmertemperatur. Als die Raumtemperatur erreicht war, wurde zunächst der spezifische monoklonale VCAM-1-Antikörper (= Diluent, 50µl/well) in die 96 well Mikrotiterplatte eingebracht (= fixer Antikörper). Nun wurden Standards, Kontrollen und Proben (je 50µl/well) zugegeben, die Platte vorsichtig geschwenkt und drei Stunden zugedeckt bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurde das in den Lösungen vorhandene VCAM-1 an den fixen Antikörper gebunden. Nach Ablauf der Bebrütungszeit folgten fünf Waschschrte. Anschließend wurde der zweite Antikörper, ebenfalls monoklonal aber Enzym-gekoppelt, (= Conjugate, 100µl/well) zu pipettiert. Erneut folgte eine Einwirkzeit (1 Stunde, Raumtemperatur, Platte abgedeckt) und nach dieser wiederum fünf Waschgänge, um den überschüssigen ungebundenen Antikörper-Anteil zu beseitigen. Nun konnte die Substratlösung (= Substrate Solution, 100µl/well) zugegeben und die Platte lichtgeschützt für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen werden. Nach der letzten Inkubationszeit wurde die Reaktion mit Hilfe der Stop Solution (100µl/well) abgestoppt. Diese Lösung enthält Schwefelsäure und somit erfolgte ein Farbumschlag von blau auf gelb in den Proben. Die Messung der unterschiedlichen Farbintensitäten der einzelnen Proben erfolgte durch ein Densometriegerät bei 450nm. Die Xflour-Software ermittelte zunächst die probenspezifische Standardkurve und setzte die gemessenen Werte dann in Bezug.

### **2.2.7 Statistische Auswertung**

Ergebnisse wurde als Mittelwert  $\pm$  SEM (= standard error of a mean ) angegeben. Zwei Gruppen wurden mit Hilfe des Student's t-test, mehr als zwei Gruppen mittels ANOVA (= analysis of variance) berechnet. Dabei wurde ein Wert von  $p < 0,05$  als signifikant angesehen.

### 3. Ergebnisse

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Verifizierung der postinfektiösen dilatativen Kardiomyopathie

#### 3.1.1 Der Hämodynamik

In der Herzkatheteruntersuchung wurde exemplarisch an 5 Kontroll- und 4 mit CVB3 infizierten Tieren, die Ausbildung der DCMi nach Infektion mit dem Cocksackievirus B3 nachgewiesen. Um eine kardial eingeschränkte Funktion beweisen zu können, erfassten wir die Unterschiede bezüglich der Schlagarbeit, dem Schlagvolumen, in dem Herzminutenvolumen und der Herzfrequenz. Die drei Parameter, die die Herzleistung widerspiegeln, waren jeweils in der Gruppe mit DCMi signifikant vermindert. Tabelle 9 zeigt die wichtigsten Ergebnisse im Überblick.

	<b>Kontrollgruppe (n=5)</b>	<b>CVB3-DCM (n=4)</b>	<b>P =</b>
<b>(Schläge/min)Schlagarbeit (mmHg*µl)</b>	846 ± 486,5	176±39,7	0,04
<b>Schlagvolumen (µl)</b>	12±5,42µl	4±1,6µl	0,02
<b>Herzminutenvolumen (µl/min)</b>	4706±1929,4	1065±371,8	0,02
<b>Herzfrequenz</b>	410±82,1	430±103	0,76

*Tabelle 9: wichtige hämodynamische Parameter im Überblick: die kardiale Funktion der erkrankter Mäuse ist sowohl bei der Schlagarbeit, als auch bezüglich der Schlagvolumina signifikant vermindert.*

Gerade die Schlagarbeit, als Anzeichen der aufgetragenen Kraft des Herzmuskels, war bei den an postinfektiöser dilatativen Kardiomyopathie leidenden Mäusen signifikant niedriger. So konnten nur noch Werte von 176±39,7 mmHg\*µl im Vergleich zu 846 ± 486,5 mmHg\*µl bei den gesunden Tieren erreicht werden (siehe Bild 19).



### 3. Ergebnisse

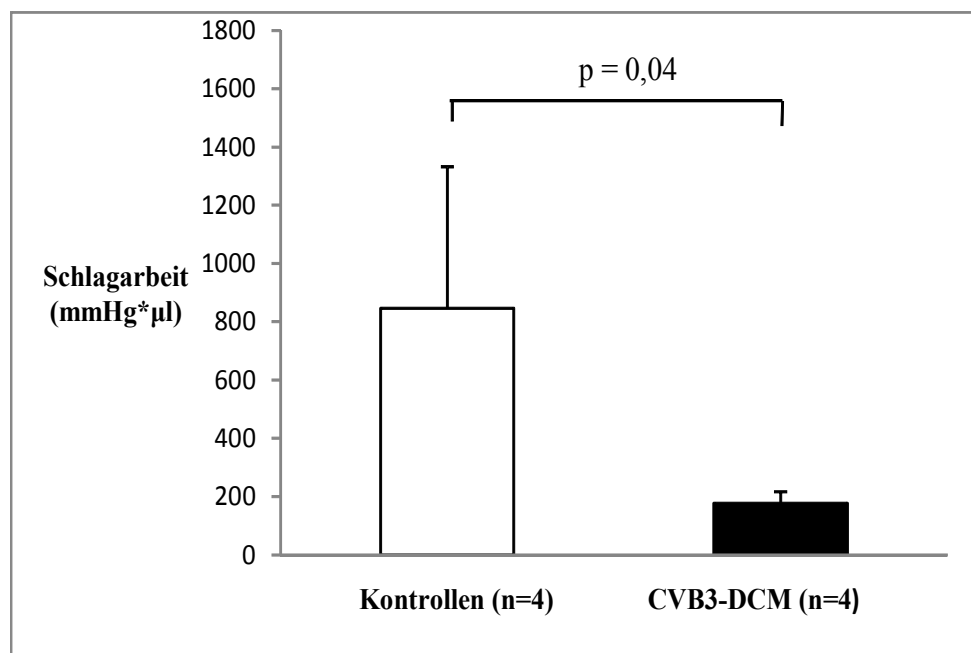


Abbildung 19: Vergleich der Schlagarbeit in mmHg\*µl: es zeigt sich eine deutliche Verschlechterung bei den Tieren mit CVB3-DCM.

Auch das Schlagvolumen (= SV) und in dessen Folge auch das Herzminutenvolumen (= HMV) war bei den infizierten Mäusen deutlich geringer. Das Einzelschlagvolumen eines an DCM erkrankten Tieres lag bei  $4 \pm 1,6 \mu\text{l}$  im Vergleich zu  $12 \pm 5,42 \mu\text{l}$  der gesunden Kontrollen ( $p = 0,02$ ). Das HMV fällt somit mit  $1065 \pm 371 \mu\text{l}/\text{min}$  (DCM) zu  $4706 \pm 1929 \mu\text{l}/\text{min}$  (Kontrolltiere) deutlich niedriger aus ( $p = 0,02$ ). Siehe dazu auch Abbildung 20 und 21.

### 3. Ergebnisse

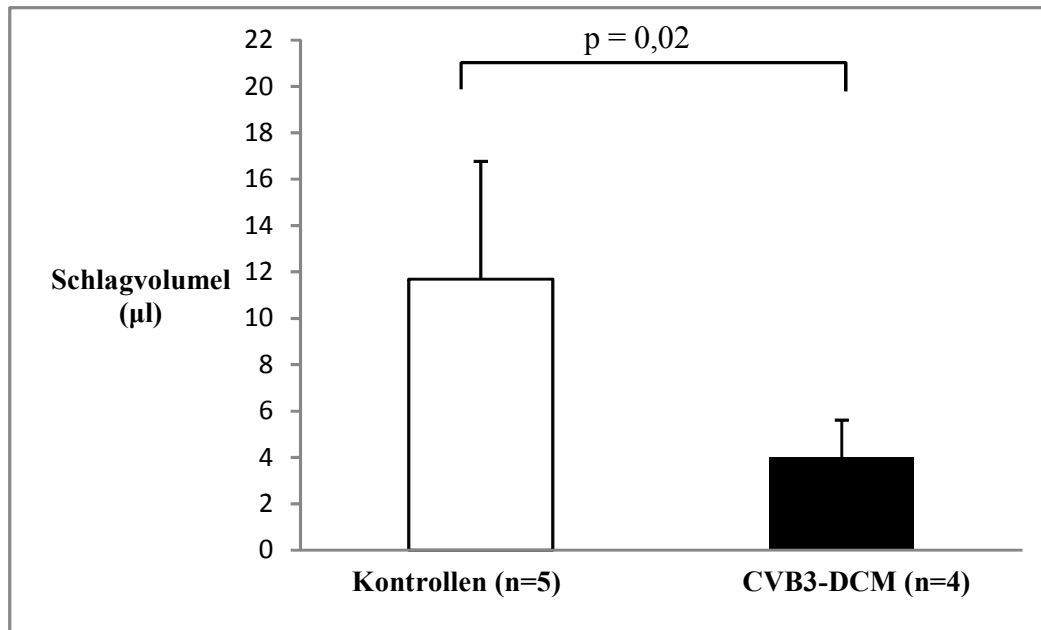


Abbildung 20: das Einzelschlagvolumen fällt in der Gegenüberstellung zu den gesunden Tieren bei den an DCMi erkrankten Tieren dreifach niedriger aus.

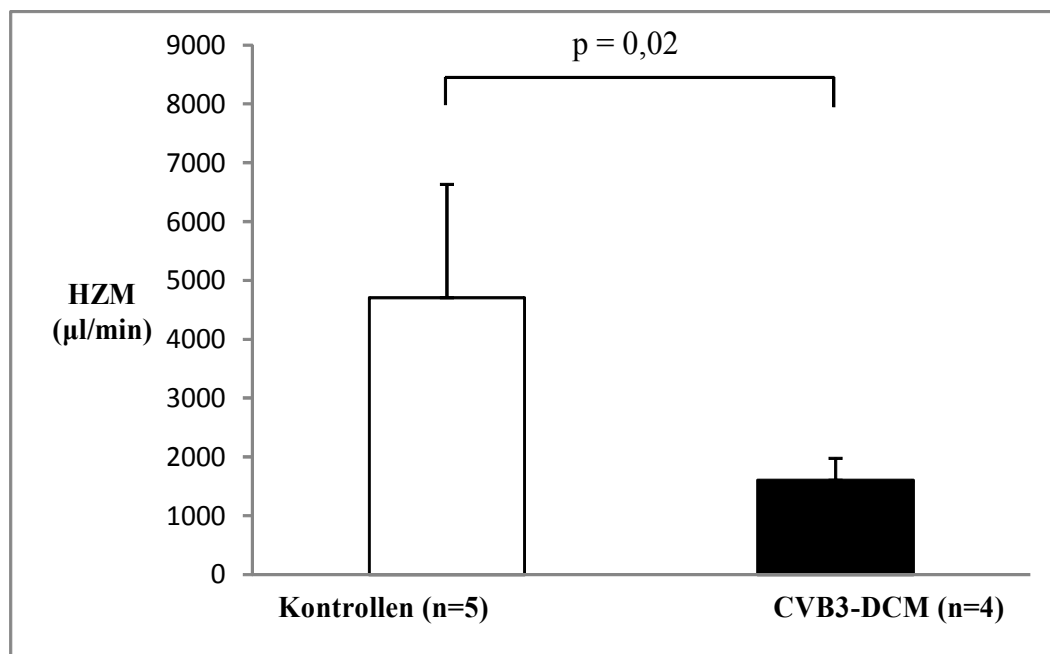


Abbildung 21: Das Herzminutenvolumen ist ebenfalls signifikant vermindert in der Gruppe mit postinfektiöser DCM in Gegenüberstellung zu gesunden Kontrollmäusen.

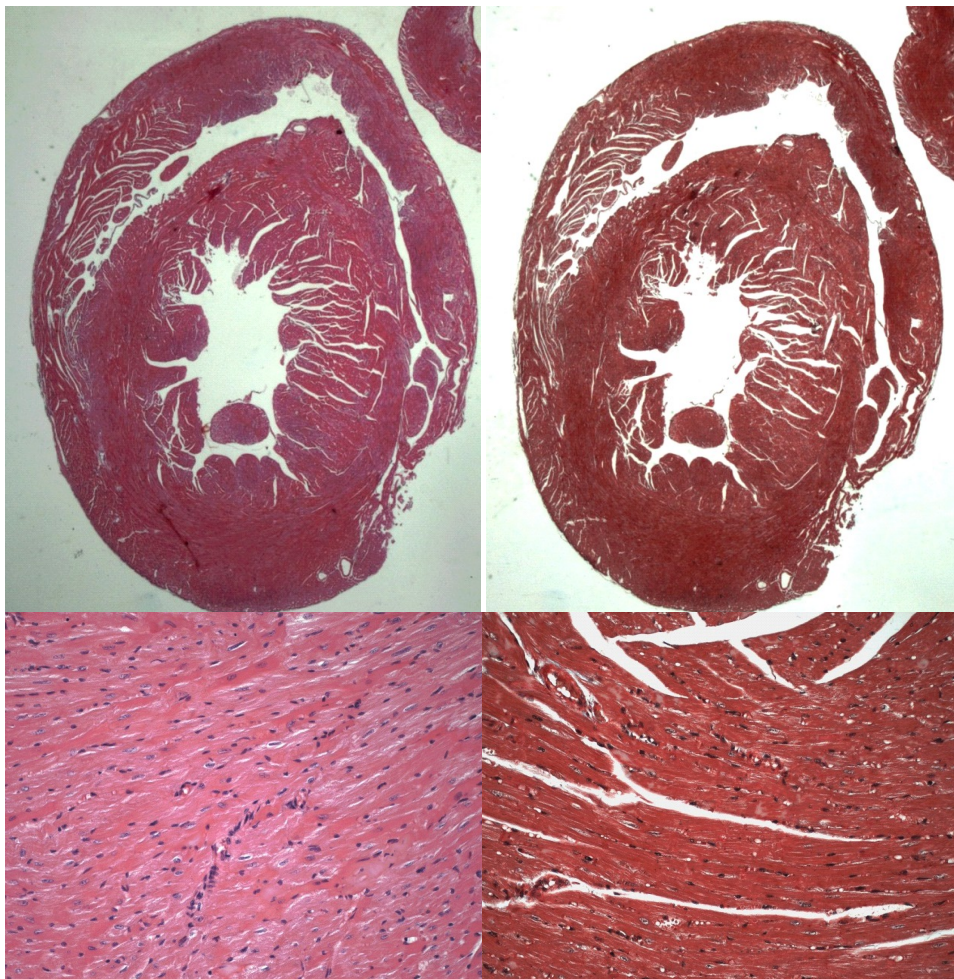
Anhand dieser Parameter konnte somit gezeigt werden, dass der Cocksackievirus B3 bei SWR/J (H-2<sup>a</sup>) Mäusen eine DCMi auslöst. Dies spiegelt sich in einer deutlich erniedrigten Herzfunktion wider.

### 3. Ergebnisse

#### **3.1.2 Histologie**

Bei den Mäusen beider Versuchsgruppen wurde nach der Erstuntersuchung unterhalb der Klappenebene Herzmuskelgewebe entnommen und davon histologische Schnitte angefertigt. Alle Schnitte wurden anschließend nach Erkißson (siehe Kapitel 2.2.4.1 Material und Methoden) ausgewertet.

Bis auf eine Maus waren alle Tiere der Kontrollgruppe gesund und zeigten somit auch in der Histologie keinerlei Entzündungsreaktion (siehe Abbildung 22).

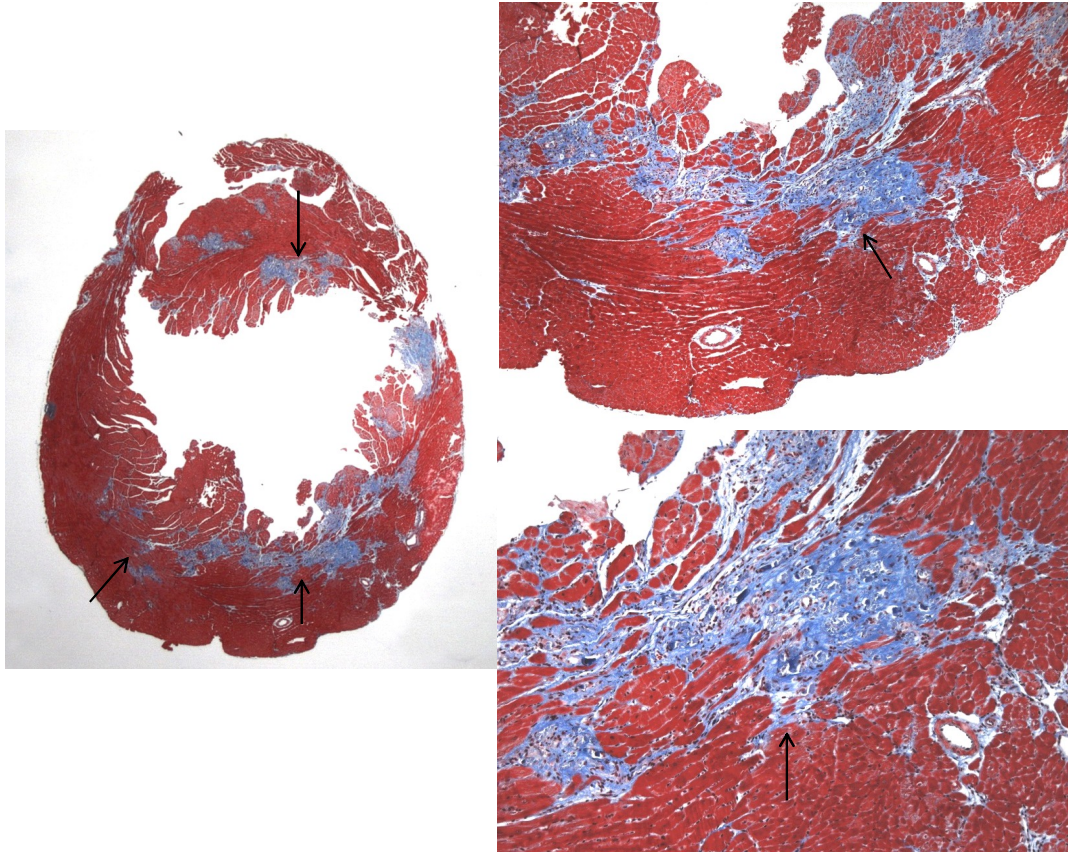


*Abbildung 22: repräsentativer Schnitt eines gesunden Mäuseherzens unterhalb der Klappenebene. Links in der HE-Färbung und rechts in der Masson-Trichromfärbung. In keinem Färbeverfahren zeigt sich ein Hinweis auf Entzündung oder fibrotischen Umbau.*

*Die Aufnahmen sind oben mit 2,5 facher und unten mit 20facher Vergrößerung durchgeführt.*

### 3. Ergebnisse

Alle Tiere, die mit dem Cocksackievirus infiziert wurden, bildeten eine DCMi in unterschiedlicher Schwere aus. Besonders das pathologische Remodelling des Herzmuskelgewebes und die Dilatation des linken Ventrikels zeigen sich in den Abbildungen 23 bis 25.



*Abbildung 23: Zeigt eine DCMi Grad 3 in der Trichromfärbung. Der Schnitt ist unterhalb der Klappenebene entnommen. In der Übersichtsaufnahme (oben) wird bereits eine Erweiterung des Kammerlumens sichtbar. Besonders deutlich wird auch der fibrotische Umbau im Myokard durch die intensive Blaufärbung von kollagenen Fasern mit Hilfe von diesem Verfahren (siehe blaue Pfeile).*

*Die Vergrößerungen sind 1,25fach (oben Mitte), 5fach (links unten) und 10 fach (rechts unten)*



### 3. Ergebnisse

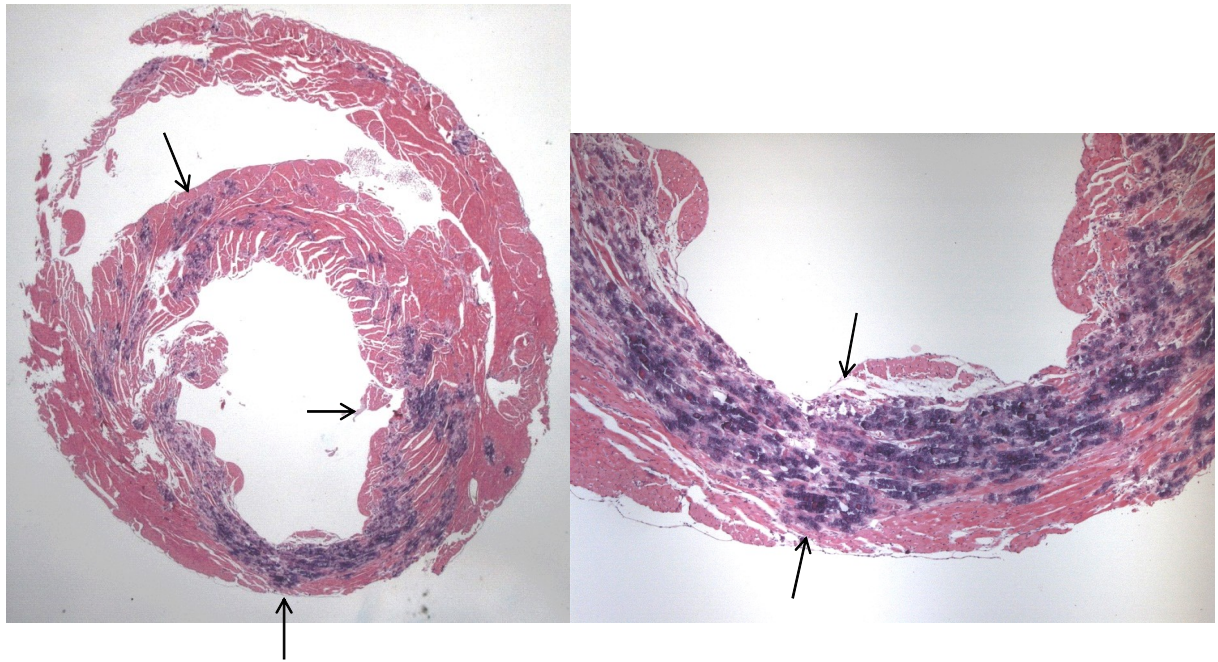


Abbildung 24: DCMi Grad 4 der HE-Färbung, Schnitt unterhalb der Klappenebene. Es zeigt sich bereits deutlich das ausgedünnte, fibrotische Myokard (schwarze Pfeile), teilweise ist der komplette Herzmuskel durch kollagene Fasern ersetzt. Weiterhin wird die Aufweitung des linken Ventrikels sichtbar.

Abbildungsvergrößerung rechts 1,25fach und links 5fach.

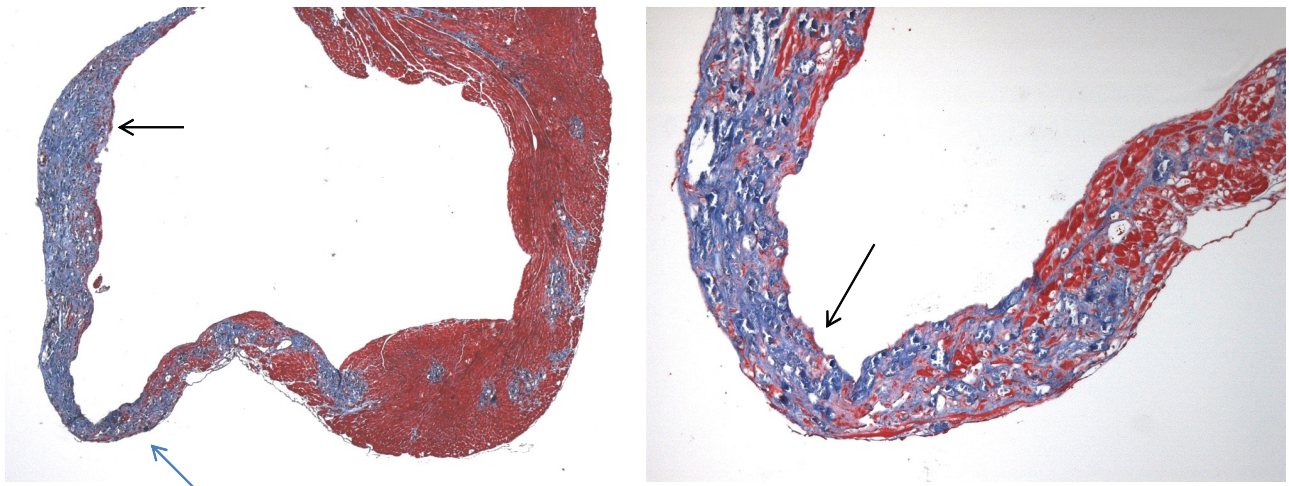


Abbildung 25: DCMi Grad 4 in der Trichromfärbung. Es zeigt sich nicht nur die Dilatation, sondern auch ein Aneurysma der linken Kammer (blauer Pfeil). Das Herzmuskelgewebe ist in diesem Bereich fast vollständig durch Bindegewebe (Blau in der Trichromfärbung, siehe schwarze Pfeile) ersetzt.

Abbildungsvergrößerung rechts 1,25fach und links 5fach.

## 3.2 Analyse von Zirkulation und Homing der Knochenmarksstammzellen

### 3.2.1 Screening mittels Real-Time PCR

Um die potentiellen Homingmechanismen, die bei der Migration von Knochenmarksstammzellen in das Herz bei der CVB3 induzierten dilatativen Kardiomyopathie involviert sein können, zu ermitteln haben wir 16 Herzen (jeweils n=8) auf myokardialen Homingfaktoren (SDF-1, SCF, P-Selectin, ICAM, VCAM-1) untersucht. Als Screeningverfahren wählten wir die Real-Time PCR, um mögliche Veränderungen der Expression bereits im mRNA-Stadium zu erkennen. In dieser ersten Untersuchung stellten wir fest, dass VCAM-1 auf der mRNA-Ebene in der Gruppe der postmyokarditischen Mäusen 18fach erhöht war. Das entspricht einem signifikanten Unterschied mit  $p = 0,03$ . Alle anderen Homingfaktoren zeigten keinen signifikanten Unterschied. Die Daten werden in Abbildung 26 nochmals im Detail gezeigt.

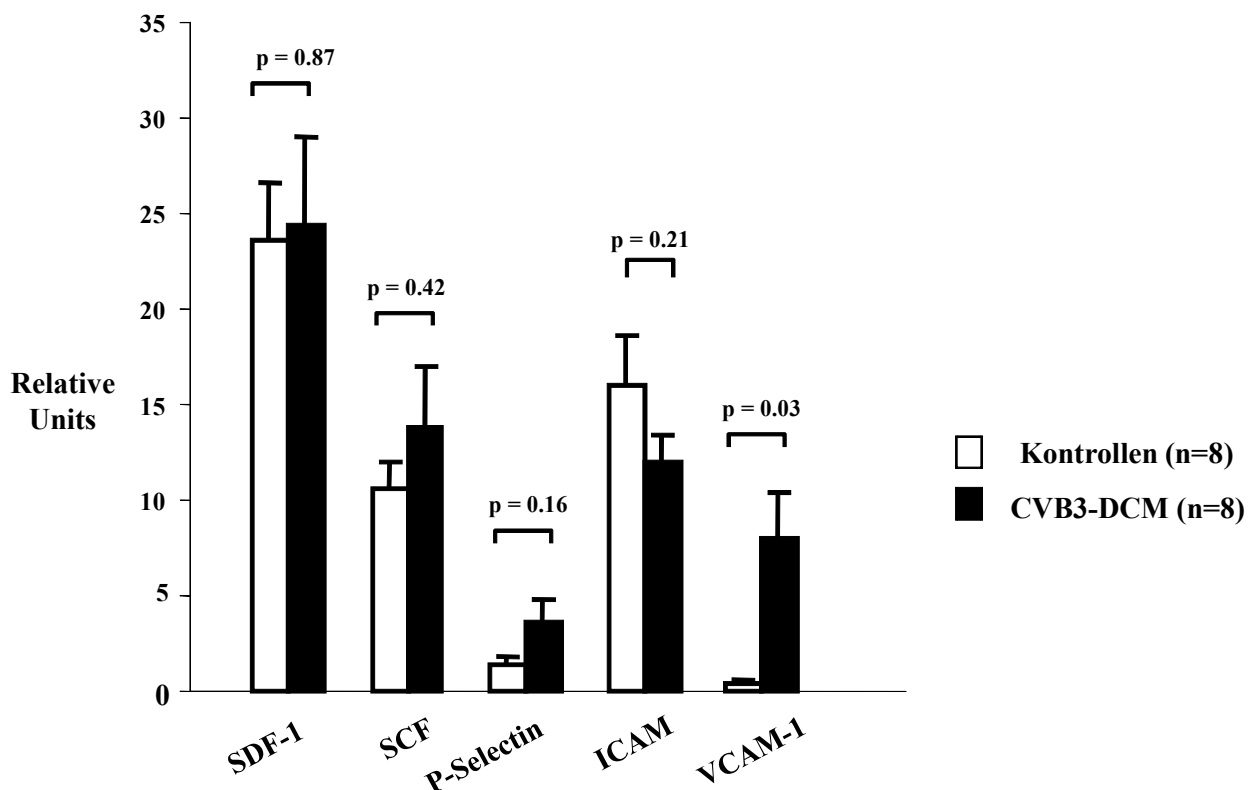
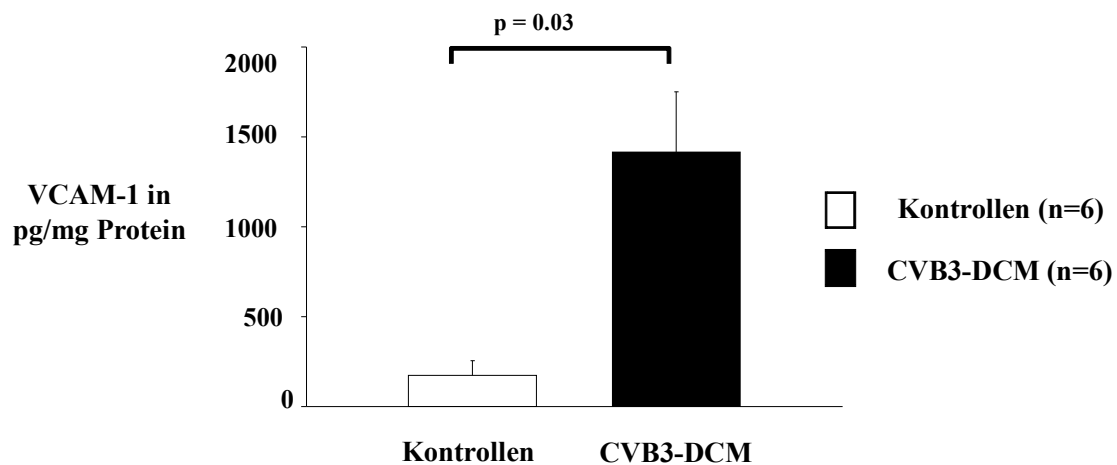


Abbildung 26: Expression der wichtigsten myokardialen Homingfaktoren auf mRNA-Level mit Hilfe der Real-Time PCR. Die Untersuchung zeigt eine 18-fach höhere Expression von VCAM-1 bei den Mäusen mit CVB3-DCM im Vergleich zu den gesunden Kontrollen.

### 3. Ergebnisse

#### **3.2.2 Bestätigung mittels ELISA-Verfahren**

Um das Ergebnis der gezeigten VCAM-Expression auf Proteinebene zu bestätigen, untersuchten wir VCAM-1 mit Hilfe des ELISA-Verfahrens. Dazu wurden jeweils 6 Herzen in jeder Versuchsgruppe auf ihre VCAM-1-Expression analysiert. Wie in Abbildung 27 dargestellt, zeigte es sich, dass in den DCMi-Mäusen der Anteil signifikant ( $p = 0,03$ ) höher ist als in den gesunden Vergleichstieren.



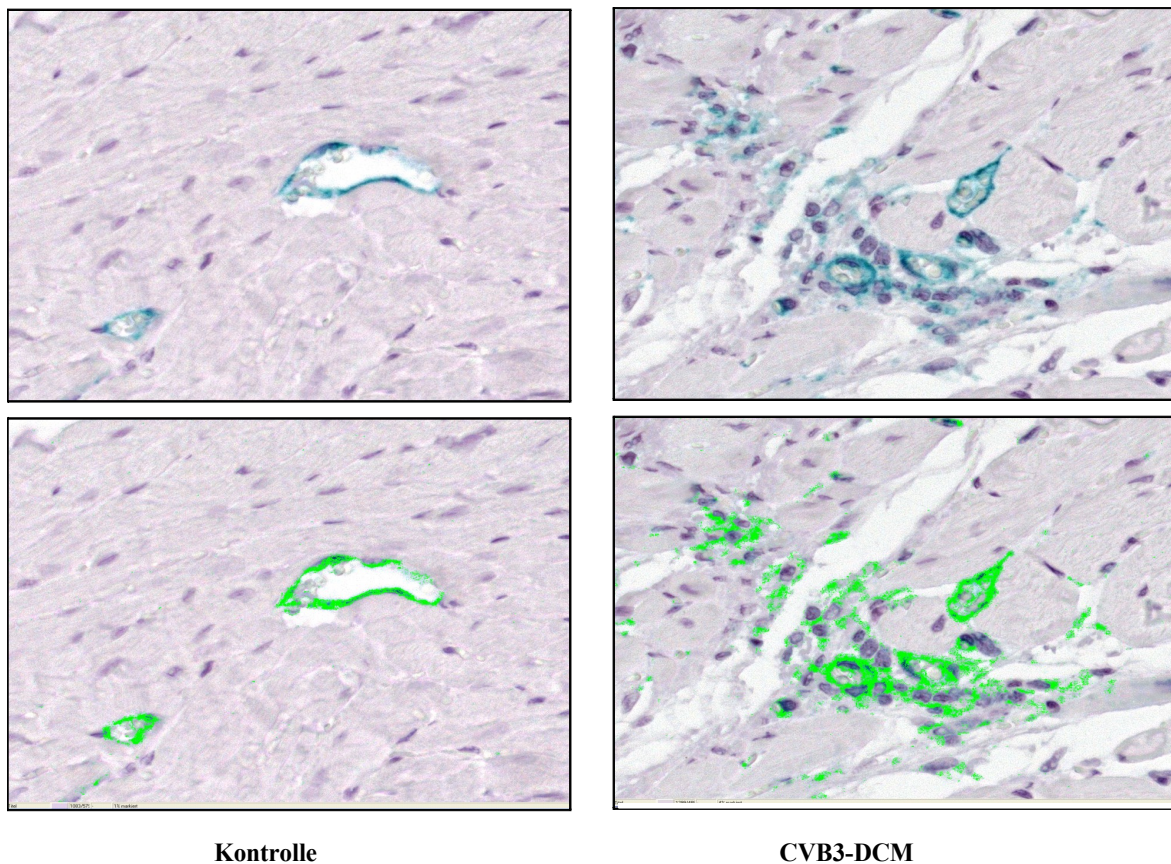
*Abbildung 27: VCAM-1-Expression auf Proteinebene analysiert mittels ELISA. Es zeigt sich auch im Proteinniveau eine signifikante Erhöhung des myokardialen Homingfaktors VCAM-1 bei den an DCMi erkrankten Mäusen im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren.*

#### **3.2.3 Immunhistochemie**

Die mittels ELISA nachgewiesenen Steigerung der VCAM-1-Konzentration sollte mit einer weiteren Methode verifiziert werden. Deshalb untersuchten wir die murinen Herzen mittels einer immunhistochemischen Färbung auf VCAM-1 (Abbildung 28). Pro Herz wurden 4 Gesichtsfelder auf VCAM-1 gescannt. In den Herzen der Versuchsgruppe war VCAM-1 signifikant erhöht ( $p < 0,001$ ). Im Mittel konnten bei den mit dem Cocksackievirus B3 infizierten Mäusen eine VCAM-1-Expression von  $3,75 \pm 1,17\%$  gegenüber  $1,1 \pm 0,31\%$  bei den gesunden Kontrollen nachgewiesen werden.



### 3. Ergebnisse



*Abbildung 28: Herzschnitt mit immunhistochemischer Färbung auf VCAM-1:*

*Die obere Reihe zeigt repräsentative Färbungen (VCAM-1 erscheint blau) der Versuchstiere, links eine gesunde Kontrollmaus und rechts eine an DCMi erkrankte Maus. Die untere Reihe zeigt die zugehörigen Quantifizierungsabbildungen (VCAM-1 erscheint grün).*

#### **3.2.4 Peripheres Blut und Knochenmark**

Um den Einfluss der Coxsackievirusinfektion und in deren Folge der postinflammatorischen DCM auf die endogene Stammzellzirkulation zu erforschen, analysierten wir sowohl das periphere Blut, als auch das Knochenmark unserer Versuchstiere. Wir erwarteten eine Erhöhung im peripheren Blut und einer Erniedrigung im Knochenmark der CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>-Populationen bei den kranken Mäusen als Zeichen einer gesteigerten Mobilisation.

Von Interesse für diese Arbeit waren zunächst die endothelialen Progenitorzellen (= EPCs; = CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>) und die CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/VLA-4<sup>+</sup>-Knochenmarksstammzellen, wobei VLA-4



### 3. Ergebnisse

als Ligand für den myokardialen Homingfaktor VCAM-1 fungiert. Bedeutend war, dass sowohl die endothelialen Vorläuferzellen  $CD45^+/CD34^+/CD31^+$  ( $p=0,01$ ) als auch die BMC-Subpopulation  $CD45^+/CD34^+/VLA-1^+$  ( $p = 0,02$ ) in den erkrankten Mäusen im peripheren Blut im Sinne einer erhöhten Mobilisation aus dem Knochenmark signifikant erhöht waren (siehe Abbildung 29).

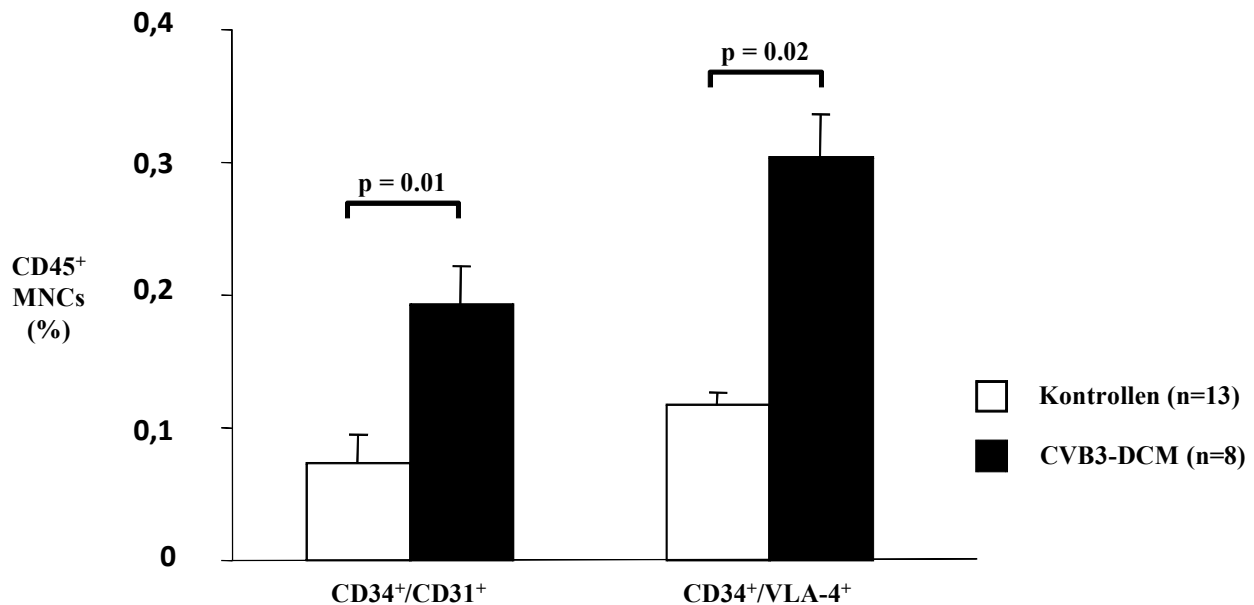


Abbildung 29: Endotheliale Progenitorzellen (= EPCs, definiert als  $CD45^+/CD34^+/CD31^+$ -Zellen) und VLA-4<sup>+</sup>-Knochenmarksstammzellen (= BMCs, definiert als  $CD45^+/CD34^+/VLA-4^+$ -Zellen) im peripheren Blut. Beide Populationen zeigen einen signifikanten Anstieg in den erkrankten Tieren.

$CD45^+$  MNCs (%): Mononukleäre Zellen im peripheren Blut (%)

Analog zu der Erhöhung im peripheren Blut zeigte sich in unserer FACS-Analyse des Knochenmarks ein signifikanter Abfall der untersuchten Faktoren bei den an DCM erkrankten Tieren in der Gegenüberstellung zu der gesunden Versuchsgruppe (Abbildung 30). Die deutliche Ausschwemmung der Stammzellen aus dem Knochenmark bei den Mäusen mit postinfektiöser DCM bestätigt unsere Vermutung der gesteigerten Stammzellmobilisation.

### 3. Ergebnisse

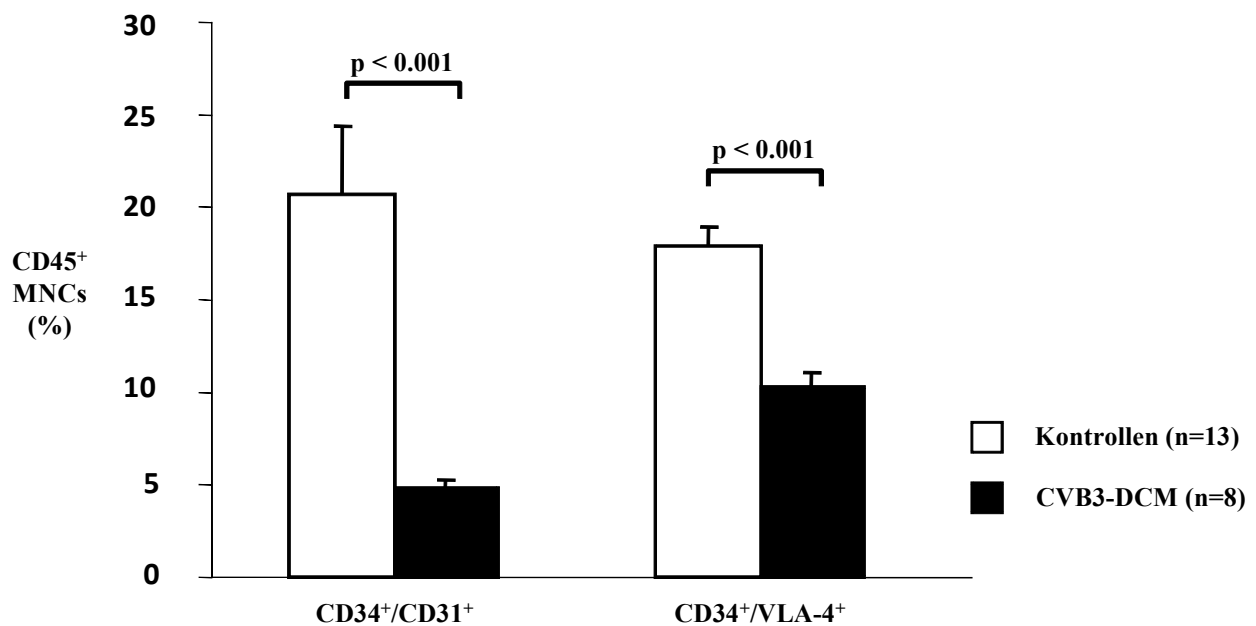


Abbildung 30: EPCs (= endotheliale Vorläuferzellen, definiert als CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>-Zellen) und VLA-4<sup>+</sup> BMCs (= Knochenmarksstammzellen, definiert als CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/VLA-4<sup>+</sup>-Zellen) im Knochenmark zeigen einen signifikanten Abfall in den infizierten Mäusen im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren.

CD45<sup>+</sup> MNCs (%): Mononukleäre Zellen im Knochenmark (%)

#### 3.2.5 Myokardiales Homing von Knochenmarksstammzellen

Um den Einfluss der postinfektiösen DCM auf das Homingverhalten der adulten Knochenmarksstammzellen (CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>) weiter zu erkunden und auch eine Aussage über das Verhalten der residenten kardialen Stammzellen (CD45<sup>-</sup>/CD34<sup>+</sup>) zu erhalten, führten wir im nächsten Schritt eine FACS-Analyse der murinen Herzen durch.

Im Myokard der geschädigten Herzen zeigte sich, dass nicht nur der Anteil von endothelialen Progenitorzellen CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> signifikant erhöht ist ( $p < 0,01$ ), sondern vor allem auch der korrespondierende Ligand von VCAM-1, VLA-4<sup>+</sup> signifikant hochreguliert ist im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. So ist der Anteil von CD45<sup>+</sup>-Knochenmarksstammzellen, die VLA-4 exprimieren mit 58% bei den erkrankten Tieren 1,4fach erhöht versus 38% bei den gesunden Mäusen. Deutlich wird diese Aussage in Abbildung 31 und 32. Dies bestätigt unsere Hypothese, dass die Migration von Knochenmarksstammzellen in das postinfektiöse DCM-Herz über die VCAM-1/VLA-4-Achse vermittelt ist.

### 3. Ergebnisse

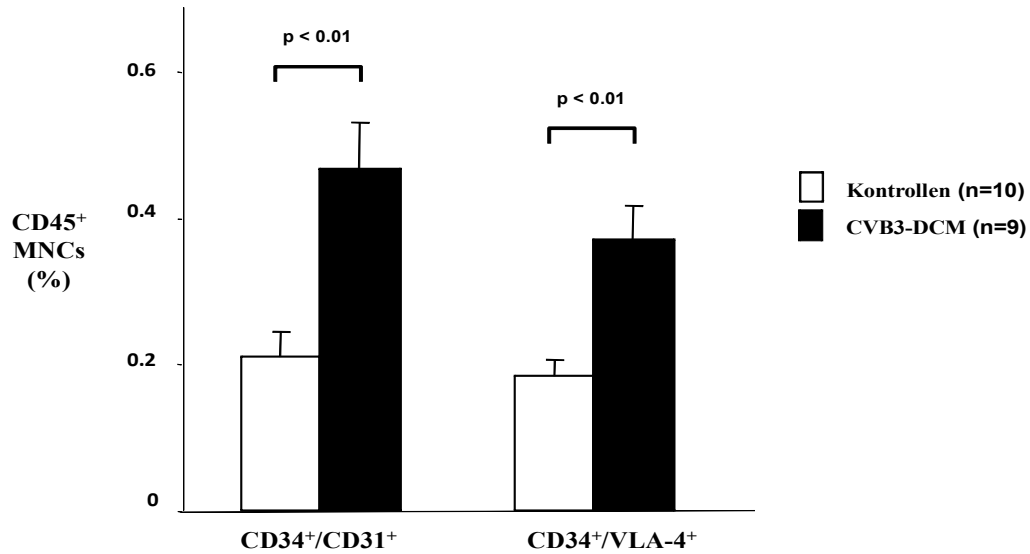


Abbildung 31: EPCs (= CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>-Zellen) und VLA-4<sup>+</sup> BMCs (= CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/VLA-4<sup>+</sup>-Zellen) migrieren in das Herz. Die FACS-Analyse der myozytenarmen kardialen Proben, zeigte eine signifikante Erhöhung der CD31<sup>+</sup>- und VLA-4<sup>+</sup>-Knochenmarksstammzellen in den Herzen, der an DCMi erkrankten Mäusen.

CD45<sup>+</sup> MNCs (%): Mononukleäre Zellen im Herzen (%); EPC: Endotheliale Progenitorzellen; BMC: Knochenmarksstammzellen

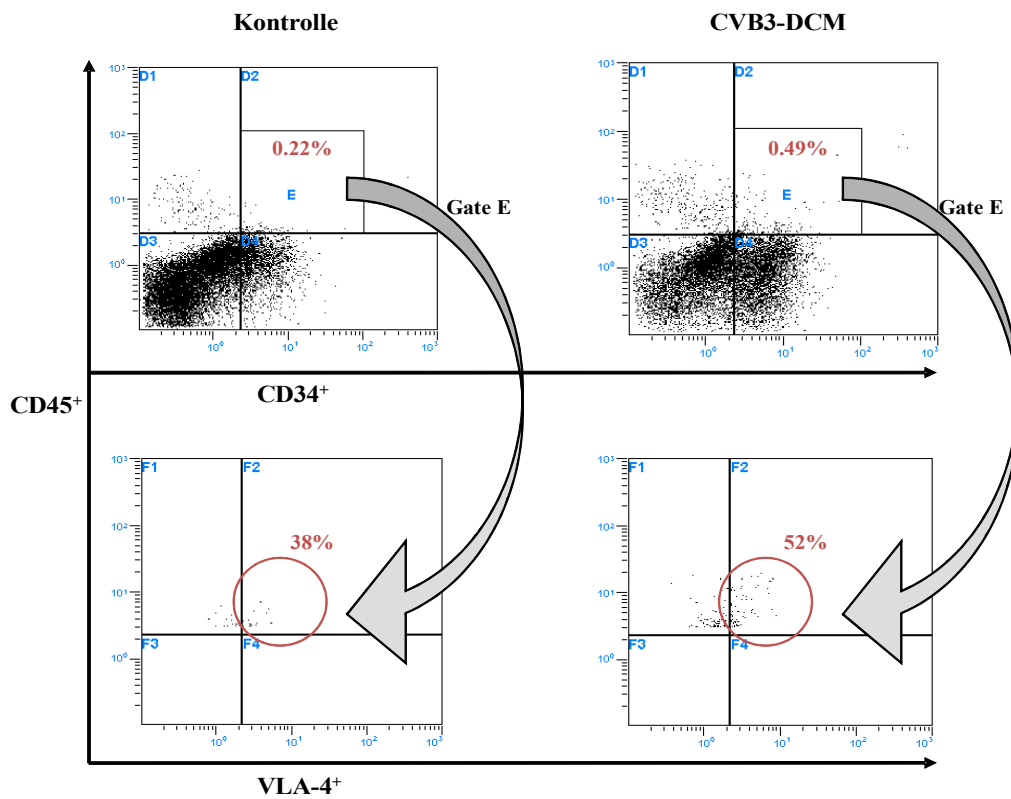


Abbildung 32: Die repräsentative FACS-Analyse zeigt die Anzahl von CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>-Zellen (Gate E) in den Herzen von gesunden Kontrollen (links oben) und erkrankten Tieren (rechts oben). Das Gaten dieser Zellen enthüllt die höherer Expression der VLA-4<sup>+</sup>-Zellen in den erkrankten Tieren (rechts unten) im Vergleich zu den gesunden Kontrollen (links unten).

### 3. Ergebnisse

Als mögliche Zielzellen von migrierten Knochenmarksstammzellen kommen die residenten kardialen Stammzellen  $CD45^-/CD34^+/Sca-1^+$  und  $CD45^-/CD34^+/c-Kit^+$  in Frage. Beide Fraktionen waren in den Mäusen mit der stattgefundenen Coxsackievirus B3-Infektion signifikant gesteigert (Abbildung 33) im Sinne von herzeigenen Stammzellvermittelten Reparaturvorgängen.

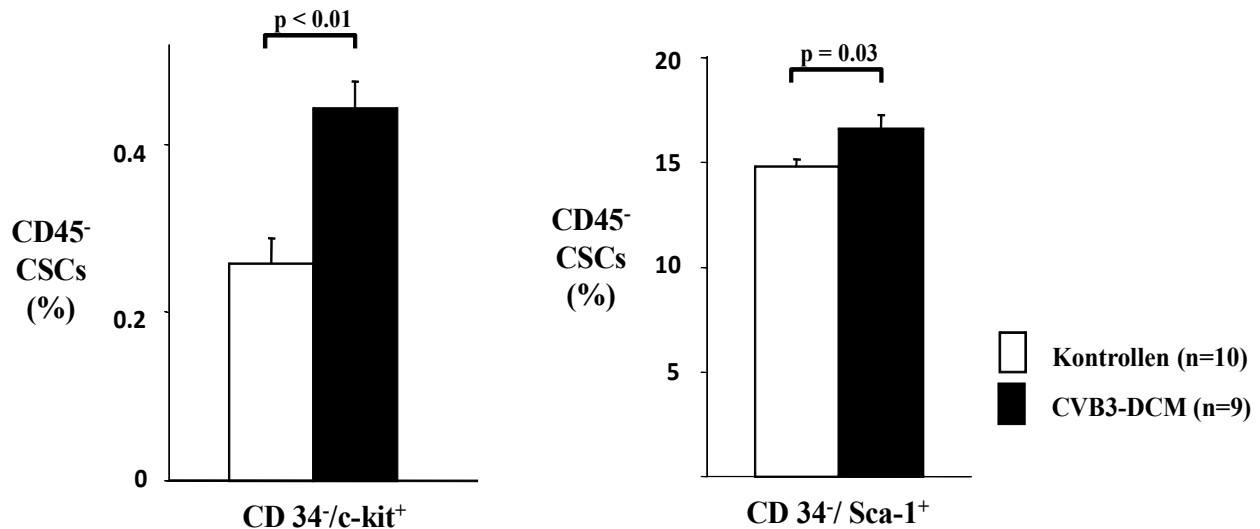


Abbildung 33: Kardiales FACS der residenten kardiale Stammzellen;

Vergleich der Subpopulationen bei Mäusen mit CVB3 induzierter DCM (n=9) und gesunden Kontrolle (n=10). Die erkrankten Mäuse zeigen eine signifikante Steigerung der gesuchten CSC-Populationen als Zielzellen der migrierten Knochenmarksstammzellen.

CSC: residente kardiale Stammzellen, definiert als  $CD45^-/CD34^+/Sca-1^+$  und  $CD45^-/CD34^+/c-Kit^+$

### 3.3 Einfluss von G-CSF

Um eine mögliche neue Therapieoption bei postinfektiöser dilatativer Kardiomyopathie zu etablieren, welche auf die protektive Wirkung von Knochenmarksstammzellen baut, ermittelten wir den Einfluss einer Behandlung mit G-CSF auf die Herzfunktion und die  $CD45^+$ - Stammzellen. Dazu teilten wir die mit dem Coxsackievirus B3 infizierten Tiere in 2 Gruppen ein. Die Einteilung erfolgte randomisiert. Die eine Hälfte erhielt eine Behandlung mit G-CSF über 10 Tage, die andere Hälfte wurde mit Salineinjektionen Placebo therapiert.

### 3. Ergebnisse

#### **3.3.1. Veränderungen der endogenen Stammzellen**

##### **3.3.1.1 Verbessertes myokardiales Homing**

Wir analysierten zunächst die Veränderungen der in das Herz eingewanderten CD34<sup>+</sup>-Subpopulationen (CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> und CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/VLA-1<sup>+</sup>) nach erfolgter G-CSF-Gabe mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Wir untersuchten insgesamt 19 murine Herzen (n=9 DCM-CVB3 mit Saline und n=10 DCM-CVB3 mit G-CSF) und konnten feststellen, dass der Anteil der CD34<sup>+</sup>-Subpopulationen nach erfolgter C-CSF-Intervention signifikant höher war (jeweils p<0.01) als bei den mit Saline behandelten Vergleichspartnern (siehe Abbildung 34).

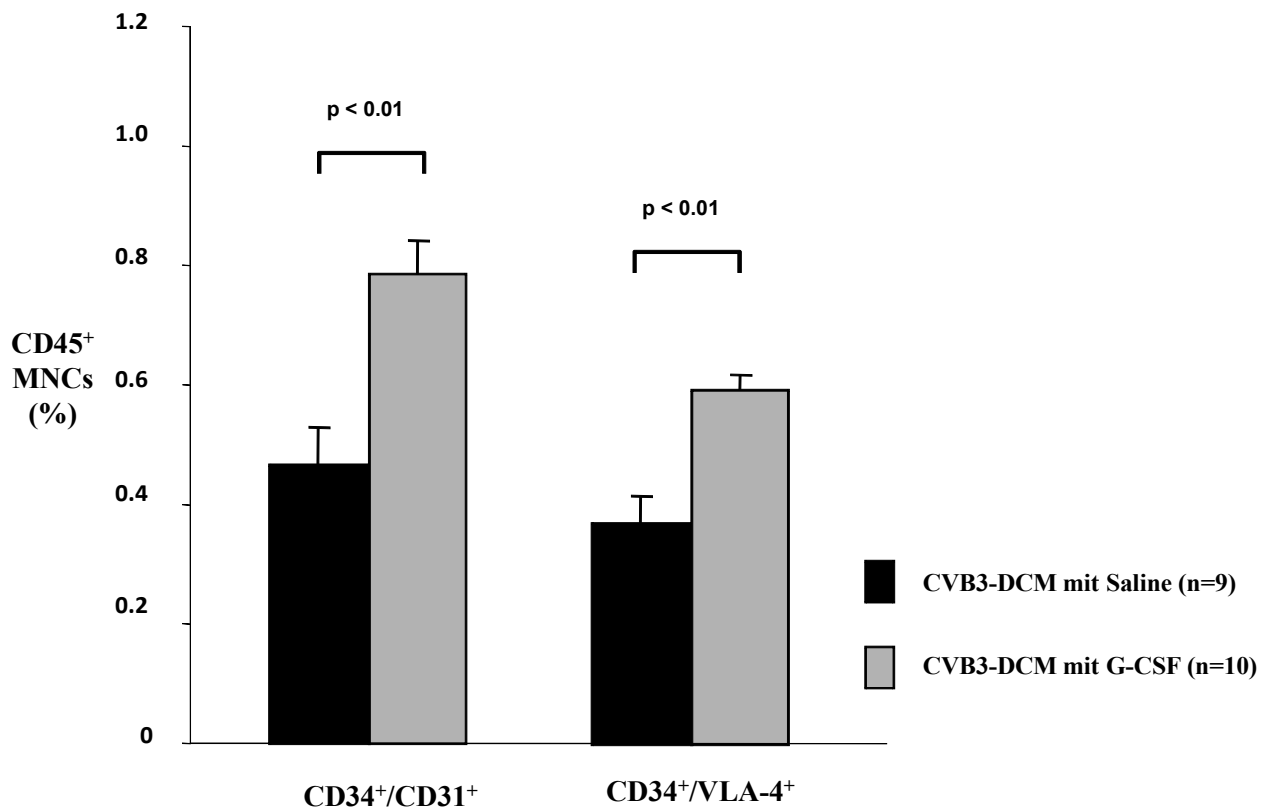


Abbildung 34: Kardiales FACS der CD45<sup>+</sup>-Subpopulation; Vergleich der Therapieeffekte von G-CSF (n=10) und Saline (n=9) bei Mäusen mit CVB3 induzierter DCM

Es zeigt sich deutlich der erhöhte Anteil von CD34/CD31- und -/VLA4 positiven Zellen in den Herzen der mit G-CSF behandelten Tiere.

CD45<sup>+</sup> MNCs (%): Mononukleäre Zellen im Herzen (%)

### 3. Ergebnisse

#### **3.3.1.2 erhöhtes Auftreten von residenten kardialen Stammzellen**

Ebenso konnten wir nachweisen, dass auch der Prozentsatz der residenten kardialen Stammzellen nach der G-CSF-Therapie angestiegen war. Ein signifikante Unterschiede ergaben sich sowohl bei der CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>-Population (p=0,03) als auch bei der Untergruppe CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/c-Kit<sup>+</sup> (p=0,04). Einen Überblick über die erhobenen Befunde gibt Abbildung 35.

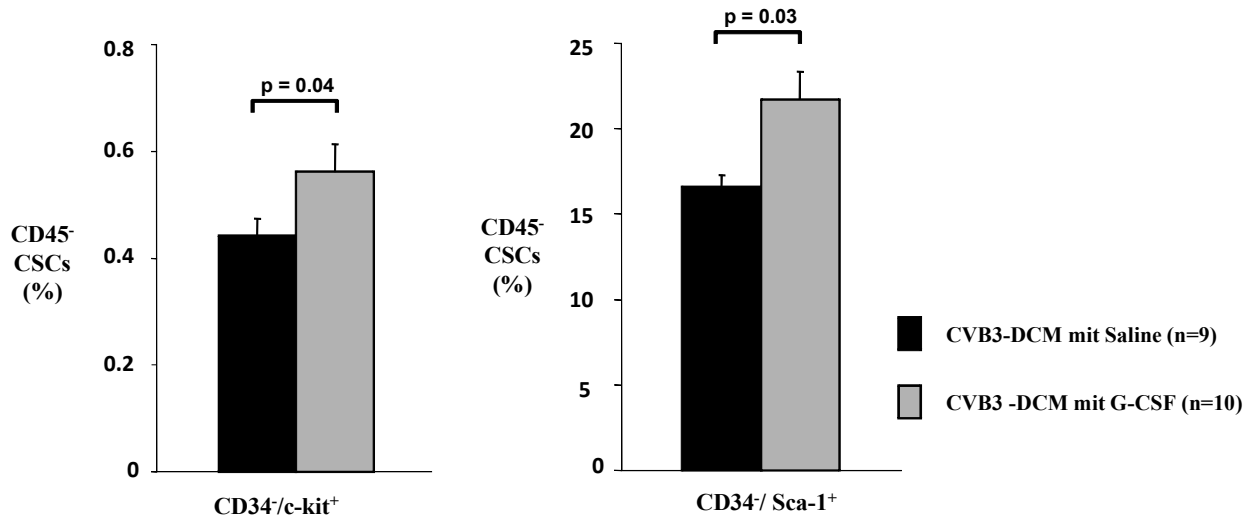


Abbildung 35: Kardiales FACS der residenten kardiale Stammzellen; Vergleich der Therapieeffekte von G-CSF (n=10) und Saline (n=9) bei Mäusen mit CVB3 induzierter DCM. Es zeigt sich eine signifikante Erhöhung der gesuchten CSC-Populationen bei den mit G-CSF behandelten Tieren im Vergleich zu den Saline-behandelten Kontrollmäusen.

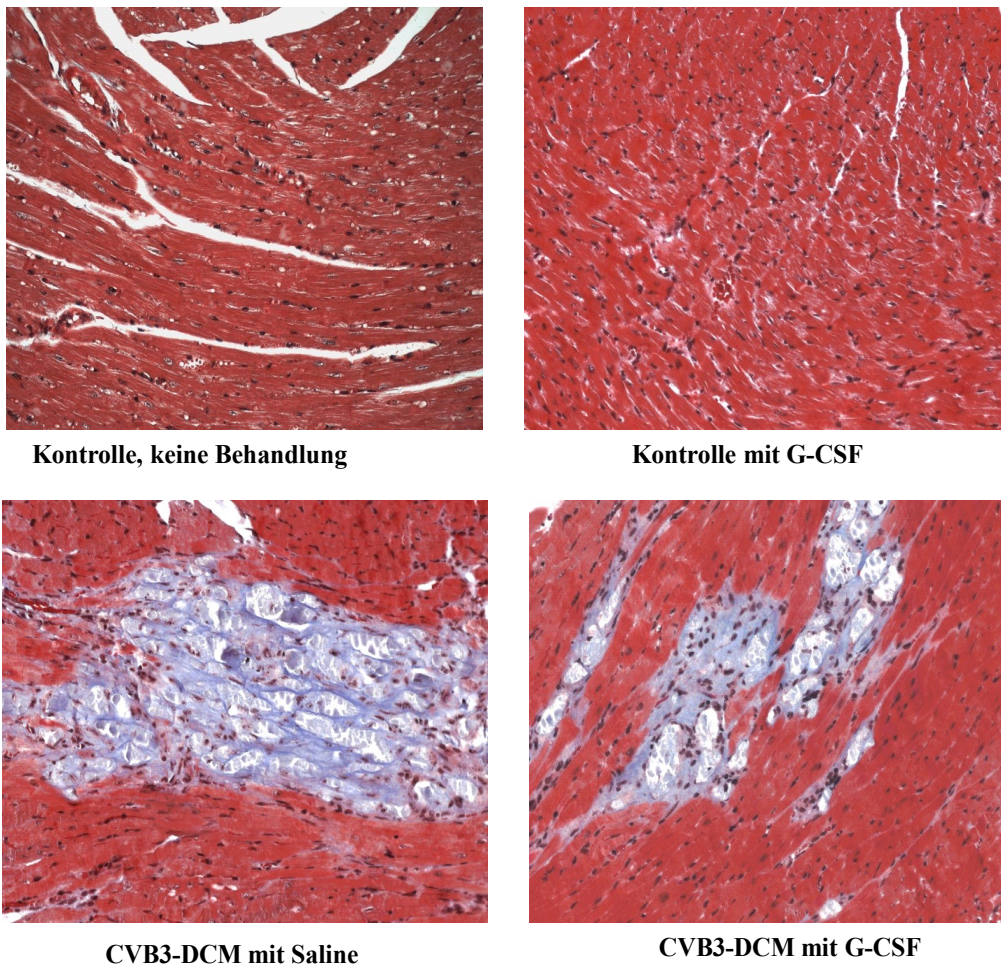
CSC: residente kardiale Stammzellen, definiert als CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup> und CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/c-Kit<sup>+</sup>

#### **3.3.2 Veränderungen in der Histologie**

##### **3.3.2.1 Histopathologischer Befund**

Der positive Einfluss von G-CSF auf den Verlauf der DCMi spiegelte sich ebenfalls im histopathologischen Befund wieder. Dieser zeigte einen deutlichen Rückgang der fibrotischen Veränderungen im Herzmuskelgewebe von Mäusen, die mit G-CSF behandelt wurden im Vergleich zu der Saline therapierten Gruppe. In Abbildung 36 finden sich repräsentative histologische Schnitte der verschiedenen Gruppierungen.

### 3. Ergebnisse



*Abbildung 36: Befunde in der histologischen Untersuchung, Trichromfärbung: fibrotisch veränderte Areale des Herzmuskelgewebes erscheinen blau.*

*oben: Kontrolltiere ohne und mit G-CSF-Therapie. Es ist keine Fibrose des Herzmuskels ersichtlich.*

*unten: DCMi ohne und mit G-CSF-Behandlung. Es zeigt sich ein deutlicher Rückgang des fibrotischen Umbaus der Kardiomyozyten bei den Mäusen nach G-CSF-Gabe.*

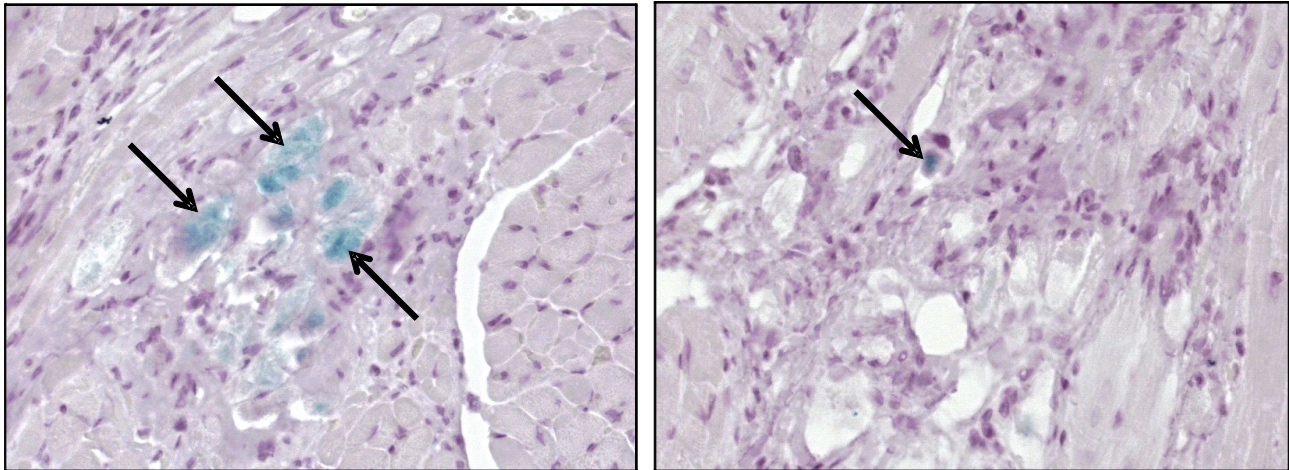
#### **3.3.2.2 Einfluss auf die Apoptose**

Um den Einfluss von G-CSF auf das Apoptoseverhalten der myokardialen Zellen bei der DCMi zu erforschen und den Unterschied im Verhalten sichtbar zu machen, untersuchten wir die murinen Herzen weiterhin in der Immunhistologie. Mittels einer Färbung auf Capase-3 konnten wir nachweisen, dass der Anteil von apoptotischen Zellen in der mit G-CSF therapierten Hälfte signifikant geringer ausfällt als in der scheinbehandelten Hälfte (siehe Bild 37). Diese Verringerung



### 3. Ergebnisse

korreliert gut mit dem verminderten pathologischen Remodelling (siehe 3.2.2.1) und der gesteigerten kardialen Funktion (siehe 3.2.3) der mit G-CSF behandelten Gruppe.



**CVB3-DCM mit Saline**

**CVB3-DCM mit G-CSF**

*Abbildung 37: Immunhistologie auf Caspase-3, apoptotische Zellen sind mit schwarzen Pfeilen markiert*

*DCMi ohne G-CSF-Behandlung (links) und DCMi mit G-CSF-Therapie (rechts). Ein deutlicher Rückgang des apoptotischen Zellanteils im Myokard nach G-CSF-Gabe wird sichtbar.*

#### **3.3.3 Verbesserung der Herzfunktion nach G-CSF im MRT**

Damit wir eine Verlaufskontrolle der Herzfunktion erhalten konnten, untersuchten wir die Mäuse mit Hilfe eines kardialen MRT. Die erste Untersuchung erfolgte vor der Behandlung, aber bereits nach der Randomisierung der Gruppen und diente als Ausgangswert. In dieser zeigten alle Tiere ( $n_{\text{gesamt}}=20$ ) die erwartete Verschlechterung der Herzfunktion mit einer deutlich eingeschränkten Ejektionsfraktion ( $46,5\pm 3\%$ ) und einen sichtbaren globalen Wandbewegungsstörung.

Der Wiederholungsscan konnte bei 91% aller Tiere (jeweils ein Tier pro Gruppe fiel aus) durchgeführt werden. Die Ursache lag allerdings nicht in dem Versterben der Tiere, sondern in einem insuffizienten EKG-Signal während der laufenden Untersuchung. Somit konnten die Ergebnisse dieser beiden Aufnahmen nicht verwertet werden.

Im Vergleich zu den Voruntersuchungen zeigte die mit G-CSF behandelte Gruppe ( $n=9$ ) eine Steigerung ihrer Auswurffraktion,  $44\pm 4\%$  zu  $48\pm 1\%$ , was einer Steigerung der Delta-EF von  $4,1\pm 1,8\%$  entspricht. Die mit Saline therapierten Mäuse wiesen eine geringfügige Verschlechterung



### 3. Ergebnisse

ihrer kardialen Leistung auf:  $49 \pm 2\%$  im ersten Scan und  $47 \pm 1\%$  im zweiten Scan. Die Delta-Ejektionsfraktion sank somit im Mittel um  $-2,5 \pm 2,2\%$ .

Abbildung 38 stellt den Verlauf der Ejektionsfraktionen der beiden Gruppen dar. Somit konnten wir zeigen (siehe auch Abbildung 39), dass die mit G-CSF behandelte Gruppe im Vergleich zur Placebogruppe nun mehr eine signifikant verbesserte Herzfunktion bezüglich der Delta-EF aufweisen kann ( $p=0,02$ ).

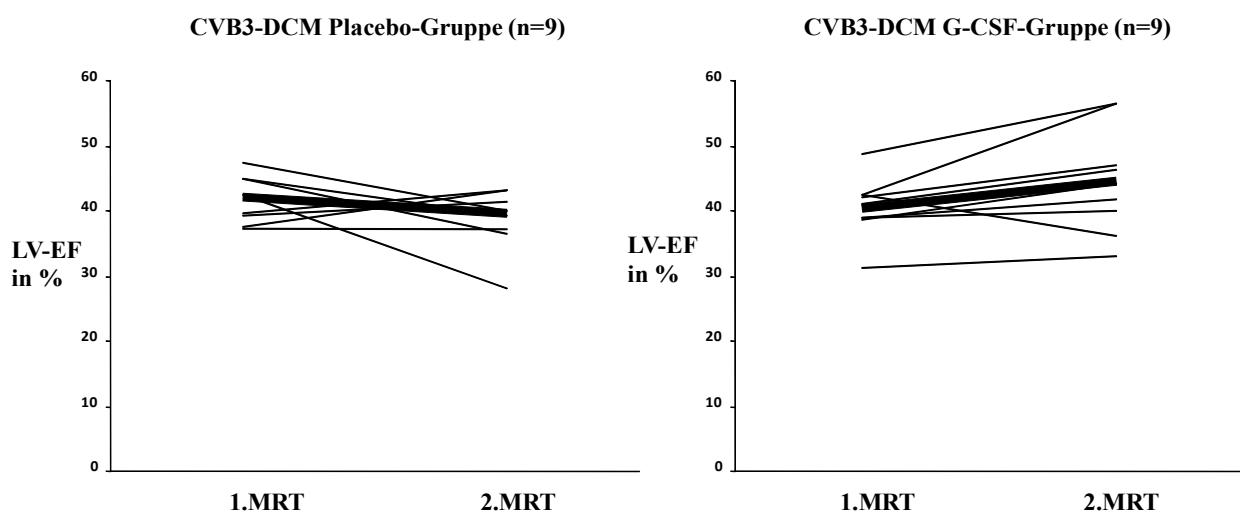


Abbildung 38: Vergleich der Ejektionsfraktion vor (1.MRT) und nach (2.MRT) der Behandlung; links: scheinbehandelte Mäuse (n=9) und rechts: G-CSF behandelte Mäuse (n=9). Nach G-CSF Therapie zeigt sich im Folgescan ein Anstieg der linksventrikulären Ejektionsfraktion bei den einzelnen Mäusen dieser Gruppe. Im Gegensatz dazu fallen die einzelnen Auswurfaktionen bei den Placebo-behandelten Tieren ab bzw. steigen weniger stark an.

### 3. Ergebnisse

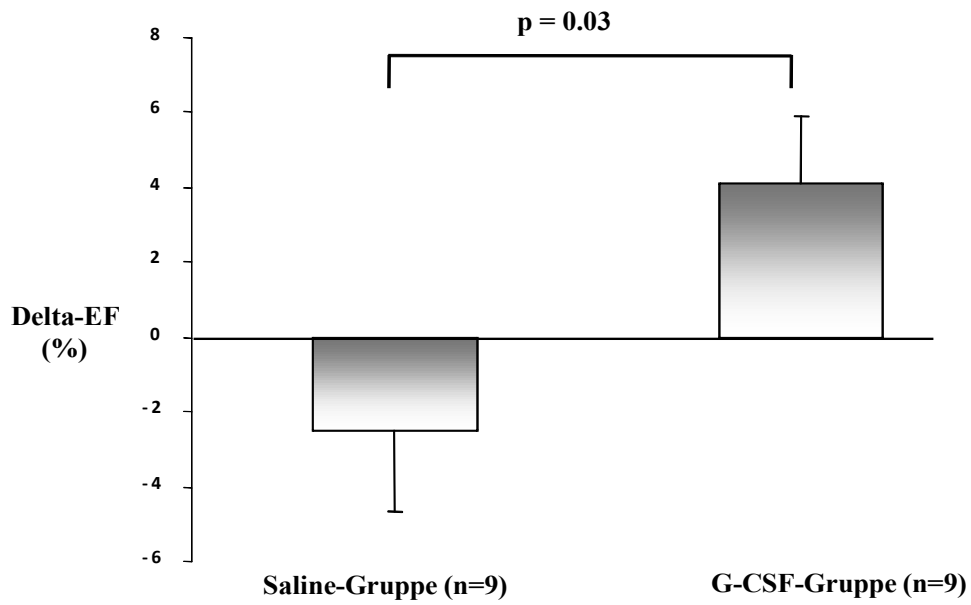


Abbildung 39: Der Unterschied der linksventrikulären Auswurf fraktion vor und nach der Therapie (Saline versus G-CSF), dargestellt als Delta-EF. Deutlich zu sehen der Anstieg der Delta-EF bei den G-CSF therapierten Mäusen (rechts) im Gegensatz zum Abfall der Delta-EF bei den scheinbehandelten Tieren (links).

### **4. Diskussion**

#### **4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der grundlegenden Evaluierung der endogenen Stammzellzirkulation bei der durch den Cocksackievirus B3 induzierten dilatativen Kardiomyopathie im Mausmodell. Dabei wurden die Stammzellsubpopulationen im Blut, im Knochenmark und im Herzen analysiert. Weiterhin wurde als Screeninguntersuchung die potentiell beteiligten myokardialen Homingfaktoren SDF-1, SCF, P-Selectin, ICAM und VCAM-1 auf mRNA-Ebene untersucht, um mögliche Migrationswege aufzuzeigen. Dabei zeigte sich eine deutlich gesteigerte Expression von VCAM-1, was auf Protein-Ebene bestätigt werden konnte. Die gesteigerte VCAM-1-Expression ging mit einer verstärkten Migration von Knochenmarksstammzellen, insbesondere VLA-4 positiven Zellen, in das geschädigte Myokard einher.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die gewonnenen Erkenntnisse zur Etablierung einer neuen Therapieoption angewandt. Ziel war es, durch die Gabe von G-CSF, was zu einer verstärkten Mobilisierung und somit zu einem gesteigerten Angebot von Knochenmarksstammzellen im peripheren Blut führt, ein verstärktes Homing und eine verbesserte kardiale Funktion zu erreichen.

Es ergaben sich folgende wesentlichen Ergebnisse:

- Nach einmaliger Infektion mit  $10^5$  pfu des Cocksackievirus B3 bilden die Mäuse des Stammes SWR/ J (H-2<sup>q</sup>) eine dilatative Kardiomyopathie aus, die sich in der hämodynamischen Untersuchung in einer deutlich reduzierten Schlagarbeit und einem stark verminderten HMV äußerte. In den histologischen Befunden spiegelte sich dieses Ergebnis in einer linksventrikulären Dilatation mit intramyokardialen Fibrosierungen wider.
- Bei den erkrankten Mäusen sind die entscheidenden Knochenmarksstammzellen ( $CD45^+/CD34^+/CD31^+$  und  $CD45^+/CD34^+/VLA-4^+$ ) im peripheren Blut signifikant erhöht. Analog zu diesem Befund sind diese Subtypen im Knochenmark signifikant vermindert.
- Die residenten kardialen Stammzellen ( $CD45^-/CD34^-/Sca-1^+$  und  $CD45^-/CD34^-/c-Kit^+$ ) sind in den geschädigten Herzen signifikant gesteigert.

#### 4. Diskussion

- Das Adhäsionsmolekül VCAM-1 ist als einziger myokardialer Homingfaktor sowohl auf RNA- als auch auf Protein-Ebene bei der DCMi signifikant aufreguliert.
- Die Therapie mit G-CSF führte zu einer Steigerung der endogenen Reparaturprozesse über die VLA-4/VCAM-1-Achse.
- Nach G-CSF Gabe zeigte sich im Vergleich zu den Saline-behandelten Tieren eine verbesserte kardiale Pumpfunktion. Diese war in den histologischen Präparaten assoziiert mit einer reduzierten Anzahl von apoptotischen Kardiomyozyten und einem verminderten Fibrosegrad.

#### **4.2 Die Infektion mit dem Coxsackievirus B3 führt zur dilatativen Kardiomyopathie im Mausmodell**

Wie von Kandolf & Hofschneider und von der Gruppe um Klingel beschrieben [138]/[139], induziert der Coxsackievirus B3 nicht nur die akute Myokarditis (siehe auch Kapitel 2.2.1.2), sondern führt in der Folge auch zur Ausbildung der postinflammatorischen dilatativen Kardiomyopathie im Mausmodell bei empfindlichen Mausstämmen. Einige Mausstämme zeigten sich als natürlich resistent gegen die Infektion mit dem Coxsackievirus B3. Deshalb entschieden wir uns für den empfindlichen Mausstamm SWR/J (H-2<sup>q</sup>) [137] und konnten in unserem Modell anhand von hämodynamischen und histopathologischen Analysen die Ausbildung der DCMi bestätigen. In der Herzkatheteruntersuchung zeigte sich diese in einer stark eingeschränkten kardialen Funktion (siehe Kapitel 3.1.1). Dieser Befund korreliert gut mit den in der Histologie nachweisbaren vermehrten intramyokardialen Fibrosearealen bei den infizierten Tieren (siehe 3.1.2). Damit können wir davon ausgehen, dass die weiteren erhobenen Befunde der endogenen Stammzellzirkulation unseres murinen Modells aussagekräftig in Bezug auf die Erkrankung der postinfektiösen dilatativen Kardiomyopathie sind.

#### 4. Diskussion

### **4.3 Erhöhtes Homing der CD34<sup>+</sup>-Subpopulationen über die VCAM-1/VLA-4-Achse im murinen Modell der postmyokarditischen Kardiomyopathie**

Theiss et al. konnten in ihrer Vorarbeit zeigen, dass die zirkulierenden CD34<sup>+</sup>-Stammzellpopulationen erhöht waren bei Patienten, die an einer nicht ischämischen DCM litten. Des Weiteren fiel in dieser Studie auf, dass die Steigerung der zirkulierenden adulten Stammzellen mit der Schwere des Herzfehlers korreliert war. Allerdings fehlte eine Aufregulierung des vermuteten myokardialen Homingfaktors SDF-1 bei der nicht ischämischen DCM im Gegensatz zur ischämischen Kardiomyopathie. Aber bereits in dieser Arbeit zeigte sich eine Erhöhung des Faktors VCAM-1 sowohl bei der ICM als auch der DCM [3]. Auf diesen Erkenntnissen beruhend, etablierten wir zum einen dieses spezifische Tiermodell, um das genaue Verhalten der Knochenmarksstammzellen und deren korrespondierenden myokardialen Homingfaktoren bei einer postmyokarditischen Kardiomyopathie als eine der häufigsten Ursache einer DCM zu analysieren. Mit Hilfe der Real Time-PCR screeneten wir bekannte myokardiale Adhäsionsmoleküle (SDF-1, SCF, VCAM-1, ICAM und P-Selectin) auf Veränderungen (siehe Kapitel 3.1.3). In den Herzen der Mäuse mit postinfektiöser dilatativer Kardiomyopathie zeigte sich eine im Vergleich zu ihren gesunden Kontrollen um das 18fach erhöhte Expression des Homingfaktors VCAM-1. Mittels ELISA und Immunhistochemie konnten wir die auf RNA-Level erhobenen Befunde bestätigen: auch auf Proteinniveau zeigte sich das Molekül VCAM-1 signifikant aufreguliert.

Zum anderen untersuchten Brunner et al. in einer klinischen Studie die Veränderungen des myokardialen Homingfaktors VCAM-1 bei der DCM aufgeschlüsselt nach ihrer Ätiologie anhand einer immunhistochemischen Analyse von myokardialen Biopsien [9]. Ziel war es herauszufinden, ob die Ursache (virusinduziert versus nicht-virusinduziert) der DCM eine entscheidende Rolle bei der VCAM-1-Expression im menschlichen Herzen spielt. In diesem Vergleich konnte gezeigt werden, dass die VCAM-1-Expression nur in den menschlichen myokardialen Gewebeproben mit DCMi erhöht waren. Bei den dilatativen Kardiomyopathien anderer Ätiologien fand sich keine Aufregulierung von VCAM-1.

Somit stimmen die Erkenntnisse unseres Mausmodells mit den Ergebnissen der humanen Myokardbiopsien überein. Diese Ergebnisse werden auch durch verschiedene Studien der neunziger Jahre unterstützt, die bereits damals eine Aufregulierung des Adhäsionsmolekül VCAM-1 in akuten und chronischen Myokarditiden beweisen konnten. Die Bedeutung dieses Befundes und die daraus resultierenden therapeutischen Möglichkeiten dieses Phänomens blieben aber in dieser Zeit noch

#### 4. Diskussion

unklar [146]/[147].

VCAM-1 ist der endotheliale Ligand für VLA-4. VLA-4 ist ein spezifischer Oberflächenmarker an zirkulierenden Stammzellen und dafür bekannt, dass es an inflammatorischen Prozessen beteiligt ist. VLA-4 vermittelt unter anderem die Adhäsion von Entzündungszellen an ihrem Zielort sowohl bei akuten als auch bei chronischen Infektionen [143]. In den letzten Jahren wird die Rolle der VCAM-1/VLA-4-Interaktion bei dem Homing von Knochenmarksstammzellen genauer erforscht. Den ersten Hinweis auf eine mögliche Schlüsselrolle bei der Migration und dem Homing von adulten Stammzellen lieferten Jin et al. [148]. Sie konnten in dieser Studie zeigen, dass die Vorläuferzellen über diesen Mechanismus in den Tumor migrieren und zur Tumorneovaskularisation beitragen.

Mit diesem Wissen ermittelten wir die Verhältnisse der für uns wichtigen Stammzellpopulationen im Knochenmark, peripheren Blut und im Herzen. Nachdem wir eine Erhöhung von VCAM-1 festgestellt hatten, richteten wir unser besonderes Augenmerk auch auf den Anteil seines Liganden VLA-4. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie konnten wir bei den Tieren, welche an postmyokarditischer DCM litten, eine signifikant erhöhte Anzahl von zirkulierenden adulten Stammzellen ( $CD45^+ / CD34^+ / CD31^+$  und  $CD45^+ / CD34^+ / VLA-4^+$ ) nachweisen. Im Sinne einer durch die DCMi induzierten gesteigerten Mobilisation von Stammzellen waren die gesuchten Subtypen im Knochenmark signifikant reduziert (siehe Kapitel 3.2.4). Dieser Befund stimmte mit den Erkenntnissen von Theiss et al. [3] überein, der bei Patienten mit DCM vermehrt zirkulierende Knochenmarksstammzellen nachweisen konnte.

In der weiterführenden Untersuchung stellten wir eine signifikante Steigerung der entscheidenden Stammzellpopulationen auch im Zielorgan, dem geschädigten Herzen fest (siehe 3.2.5). Besonders bedeutend erscheint die signifikante Steigerung des Anteils der  $VLA-4^+$ -Stammzellen im Herzen der erkrankten Tiere (52% bei DCMi versus 38% bei den Kontrollen). Diese lässt auf ein verstärktes Einwandern insbesondere dieses Subtypen bei DCMi schließen und uns vermuten, dass die Interaktion zwischen VCAM-1 und VLA-4 essentiell für die Migration der Stammzellen in das geschädigte Herz ist. Weiterhin konnten wir in dieser Analyse zeigen, dass das gesteigerte Einwandern der adulten Stammzellen mit einer ebenfalls signifikant erhöhten Anzahl von residenten kardialen Stammzellen ( $CD45^- / CD34^- / Sca-1^+$  und  $CD45^- / CD34^- / c-Kit^+$ ) einherging (siehe Kapitel 3.2.5). Die residenten kardialen Stammzellen werden möglicherweise über einen parakrinen Effekt, welcher durch die migrierten Knochenmarksstammzellen vermittelt wird, stimuliert. Die residenten kardialen Stammzellen waren in letzter Zeit im Fokus der kardiologischen Forschung.

#### 4. Diskussion

Verschiedene Studien zeigten, dass die residenten kardialen Stammzellen nicht nur selbst über parakrine Wege angeregt werden, sondern auch die Kardiomyozyten zur Selbstheilung stimulieren und das Potential besitzen, sich selbst in Kardiomyozyten, Endothel oder glatten Muskulatur im Herzen zu differenzieren [52]/[149]. Damit spielen sie eine wichtige Rolle für die kardiale Regeneration und die Vermeidung von pathologischem Remodelling bei chronischen Herzerkrankungen.

Abbildung 40 gibt unser vermutetes Konzept der physiologischen Reparaturvorgänge bei der postmyokarditischen Kardiomyopathie wieder.

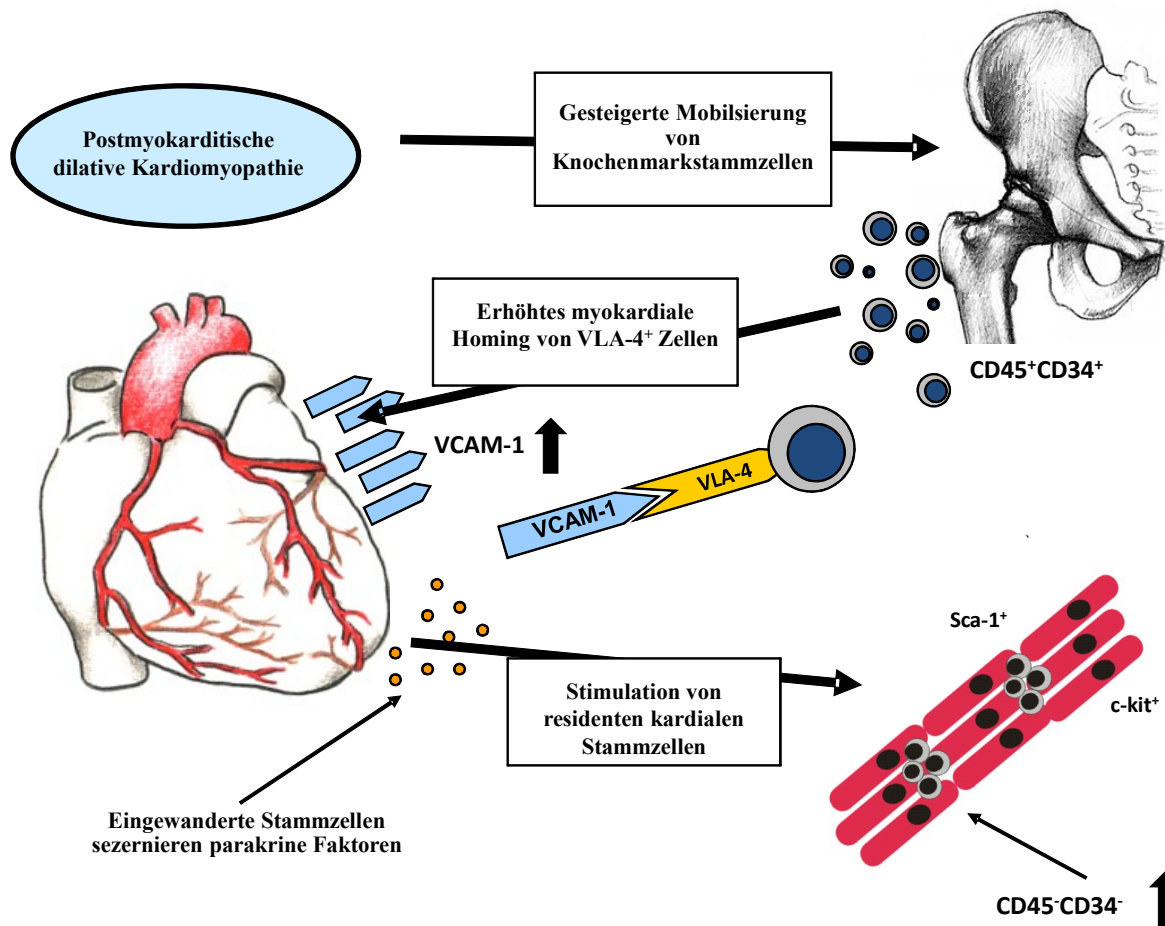


Abbildung 40: Konzept der Selbstheilungsversuche bei postinfektiöser dilatativen Kardiomyopathie modifiziert nach Brunner et al. [9]

## 4. Diskussion

### **4.4 VCMA-1/VLA-4 Achse als mögliches therapeutisches Ziel**

In den letzten Jahren ergaben sich neue Erkenntnisse über das Potential der Stammzellen bei der ischämischen Kardiomyopathie in Folge eines Myokardinfarktes [150]/[151]/[152]/[153]. Bereits 2003 konnte Askari et al. den Einfluss von SDF-1 auf das myokardiale Homing von Stammzellen und in Folge auf die myokardiale Regeneration bei der ICM beweisen [69]. Auch Zaruba et al. zeigten auf, dass in dem Fall der ischämischen Kardiomyopathie für die Inkorporation der Stammzellen in das geschädigte Myokard die SDF-1/CXCR4-Achse die ausschlaggebende Rolle spielt [68]. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde dieser Weg verstärkt das Ziel therapeutischer Bemühungen [113].

Allerdings scheint bei der untersuchten Form der nicht-ischämischen dilatativen Kardiomyopathie, dieser spezifische Mechanismus der kardialen Selbstreparatur keine Rolle zu spielen. Eine Ursache liegt in der fehlenden Aufregulierung des endothelialen Homing-Faktors SDF-1 im Herzgewebe bei postmyokarditischer DCM. Dies zeigten sowohl Theiss et al. beim Menschen [3] als auch wir in dieser Arbeit im murinen Modell. Gleichwohl konnten wir in diesem Versuch zum ersten Mal nachweisen, dass bei der virusinduzierten DCM die Migration von adulten Stammzellen in das geschädigte Myokard generell möglich ist. Gefördert wird diese über die Interaktion von VCAM-1 und VLA-4 .

Schon vor unserer Studie wurde in verschiedenen Arbeiten gezeigt, dass über VCAM-1 und VLA-4 kardioprotektive Effekte vermittelt werden. Bereits 1995 arbeiteten Yang et al. [154] mit VLA-4-Null-Mäusen. Diese verstarben zumeist im Embryonenstadium. Falls sie überlebten, zeigten sich schwere Defekte im Herzen und in den Koronararterien, die letztendlich zu schweren kardialen Blutungen und zum Tod der Tiere führten. Ebenfalls im Jahre 1995 veröffentlichte Kwee et al. seine Ergebnisse über VCAM-1 Knockout-Mäuse. Auch diese waren in den meisten Fällen nicht lebensfähig oder bildeten verschieden schwere Herzfehler aus [155]. Beide Arbeiten legen die Vermutung nahe, dass VCAM-1 und VLA-4 eine entscheidende Rolle in der Herzentwicklung spielen. Auch die Gruppe um Koch [156] zeigte, dass über die VCAM-1- Achse die Migration von endothelialen Zellen mittels VLA-4 gefördert wird und in einer gesteigerten Angiogenese resultiert. In einer Studie stellte Papayannopoulou die These auf, dass VCAM-1/VLA-4 nicht nur das Homing von Stammzellen fördert, sondern auch eine entscheidende Rolle bei der Aufnahme und Ausschüttung von Zellen aus dem Knochenmark spielt [157]. Diesen Erkenntnissen entsprechen



#### 4. Diskussion

auch die Befunde von Nakao et al., die in ihrem Mausmodell bewiesen, dass durch VCAM-1 sowohl die Migration von endothelialen Progenitorzellen als auch die Neoangiogenese gefördert wird [158].

Aktuell konnte die Gruppe um Matsuura et al. [159] die kardioprotektive Wirkung dieses Weges in ihrem murinen Modell nachweisen. Die Steigerung der Herzfunktion beruht nach Matsuura et al. vor allem auch auf einem verbesserten Überleben der Kardiomyozyten. Dieses wird ermöglicht, da über VCAM-1/VLA-4 Akt, ERK und p38 MAPK aktiviert werden, die die Herzmuskelzellen vor dem Untergang durch oxidativen Stress bewahren. Weiterhin fördert diese Achse auch die Migration von endothelialen Zellen und steigert das Überleben von transplantierten kardialen Vorläuferzellen. Somit scheinen die von VCAM-1/VLA-4 vermittelten Effekte einen entscheidenden Beitrag zu der Entwicklung von Herzmuskelgewebe durch kardiale Vorläuferzellen zu leisten. Diese Studien sowie unsere eigenen Ergebnisse sprechen dafür, dass durch die VCAM-1/VLA-4-Achse kardioprotektive Effekt vermittelt werden und insbesondere bei der postinfektiösen DCM eine essentielle Rolle spielen. Diese Achse stellt somit auch einen neuen therapeutischen Angriffspunkt für diese Erkrankung dar.

#### **4.5 Der VCAM-1/VLA-4 Reparaturmechanismus wird durch gesteigerte Stammzellmobilisation gestärkt**

In dem zweiten Teil unserer Arbeit entwickelten wir neue Therapieoption basierend auf unseren bisherigen Erkenntnissen. Hierfür setzten wir den gut erforschten und etablierten Wachstumsfaktor G-CSF ein. Dieser ist bereits seit Jahren im Rahmen von Stammzelltransplantationen bei hämatologischen Erkrankungen im klinischem Gebrauch [90-91,160]. G-CSF steigert die Ausschwemmung der Vorläuferzellen aus dem Knochenmark in das periphere Blut. In vielen Studien hatte man versucht, G-CSF nach Myokardinfarkt anzuwenden, um durch eine gesteigerte Mobilisierung kardioprotektive Effekt zu erzielen [115]/ [71]/[118]/[113].

Auf Grund viel versprechender Ergebnisse in den präklinischen Studien wurden zahlreiche klinische Studien initiiert. Allerdings konnte keine der klinischen Studien einen signifikanten positiven Effekt auf die kardiale Funktion nach Myokardinfarkt durch die G-CSF-Gabe nachweisen [125, 131-133]. Damit erhielt das Konzept der Stammzellmobilisierung nach Myokardinfarkt einen herben Rückschlag. Als mögliche Ursache dieser negativen Ergebnisse könnte ein negativer

#### 4. Diskussion

Einfluss von G-CSF auf die SDF-1/CXCR-4-Achse sein, welche bei ischämischen Erkrankungen eine entscheidende Rolle für den protektiven Effekt von Knochenmarksstammzellen zu spielen scheint [161]. Brunner et al. konnten in einem präklinischen chimären Modell bei Mäusen mit experimentellem Myokardinfarkt zeigen, dass trotz der gesteigerten Mobilisierung weniger CXCR-4<sup>+</sup> Knochenmarksstammzellen in das ischämische Myokard einwandern [72]. Das beeinträchtigt Homing lässt sich einer Studie von Honold et al. zufolge auf die proteolytische Wirkung von G-CSF auf CXCR-4 zurückführen. In ihrer Arbeit konnten sie eine deutlich verminderte CXCR-4-Expression nach G-CSF-Applikation nachweisen [161]. Möglicher Ausweg ist die Stabilisierung des korrespondierenden Homing-Faktors SDF-1. Dies lässt sich durch eine Inhibierung der SDF-1 degradierenden Protease DPP-IV erreichen [113-114].

Da bei der virusinduzierten Form der DCM die SDF-1/CXCR-4-Achse keine Rolle spielt und somit der negative Effekt von G-CSF auf diese Achse nicht zu tragen kommt, entschieden wir uns als therapeutische Option für die alleinige Gabe von G-CSF. Durch die G-CSF induzierte Mobilisierung erreicht man ein vermehrtes Angebot von Knochenmarksstammzellen, welche über die VCAM-1/VLA-4-Achse in das geschädigte Myokard migrieren könnten.

In unserem präklinischen Modell konnten wir zeigen, dass die Gabe von G-CSF sowohl zu einem gesteigerten Homing von Knochenmarksstammzellen in das Herz führt als auch zu einem Anstieg der residenten kardialen Stammzellen führt. Dieser Effekt geht mit einer reduzierten Fibrosierung des Myokards sowie mit einer deutlich verminderten Apoptoserate der Kardiomyozyten einher (siehe Kapitel 3.3.1 und 3.3.2).

Unterstützt werden unsere Ergebnisse von einer Arbeit von Shimada et al. [162], die Mäuse mit einer akuten Autoimmunmyokarditis mit G-CSF behandelt haben. Durch diese Therapiemaßnahme konnte eine signifikant verbesserte kardiale Funktion erzielt werden. Die Effekte, die zur Steigerung der kardialen Funktion führten, wurden über die Nitrit Oxidase Synthase (= NOS) vermittelt. NOS ist schon länger dafür bekannt, in die Stammzellrekrutierung einzugreifen und unterstützt somit die Hypothese, dass die Mobilisation und das Homing adulter Stammzellen ausschlaggebend ist für die Reparaturvorgänge in Herzen mit virusinduzierter DCM [163].

In Zusammenschau unserer eigenen Befunde und den vorausgegangenen Studien scheint G-CSF dazu geeignet, das durch eine DCMi ausgelöste pathologische Remodelling im Herzen im Mausmodell positiv beeinflussen zu können.

#### 4. Diskussion

##### **4.6 Die kardiale Funktion steigt durch die von G-CSF vermittelten Effekte bei postmyokarditischer DCM**

Um den tatsächlichen Einfluss von G-CSF auf die Reparaturvorgänge in den geschädigten Herzen und deren Auswirkung auf die kardiale Funktion zu erforschen, führten wir sowohl vor als auch nach der Behandlung ein kardiales MRT bei unseren Mäusen durch. Nachdem die Mäuse randomisiert in Gruppen aufgeteilt waren, folgte der erste MRT-Scan des Herzens. Die erste Aufnahme diente der Ermittlung der Ausgangsejektionsfraktion bei bestehender postinfektiöser DCM. Der zweite Scan erfasste die Veränderungen der Herzfunktion anhand der EF nach der erfolgten zehnmaligen Applikation von G-CSF im Vergleich zu den Saline-behandelten Mäusen. Somit konnten wir die Auswurffractionen der jeweiligen Maus im Verlauf beobachten und beurteilen. Bei den mit G-CSF behandelten Tieren konnten wir in der Folgeuntersuchung eine deutlich gesteigerte linksventrikuläre Auswurffraction verglichen mit den Placebo therapierten Tieren feststellen. Diese Steigerung der EF ist vergleichbar zu den Ergebnissen der stammzellbasierten klinischen Forschungen nach Myokardinfarkt. Dort konnte im Mittel eine Steigerung der linksventrikulären Funktion um 3% gegenüber der Kontrollgruppe gezeigt werden [164]/ [153]/[165].

In unserem Therapieregime erreichten wir bei den Mäusen mit virusinduzierten Kardiomyopathie sogar eine Steigerung der Ejektionsfraktion um 6,6% nach erfolgter G-CSF Behandlung. Daraus lässt sich schließen, dass G-CSF eine neue therapeutische Möglichkeit in der Behandlung der postmyokarditischen DCM darstellen könnte.

### **5. Zusammenfassung**

In dieser Arbeit konnten wir zunächst mittels Herzkatheteruntersuchungen und histologischen Methoden erneut nachweisen, dass durch den Coxsackievirus B3 bei den SWR-Mäusen eine postinfektiöse dilatative Kardiomyopathie ausgelöst werden kann.

Bei den DCMi-Tieren analysierten wir zunächst die Veränderungen der endogenen Stammzellpopulationen bei DCMi mit Hilfe der Durchflusszytometrie und konnten zeigen, dass die relevanten Subpopulationen: CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup> und CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/VLA-4<sup>+</sup> im peripheren Blut auf- bzw. im Knochenmark signifikant herunter reguliert sind. Analog finden sich im Herzen ebenfalls eine signifikante Zunahme der betreffenden Subtypen wie auch eine signifikante Steigerung der residenten kardialen Stammzellen CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup> und CD45<sup>+</sup>/CD34<sup>+</sup>/c-Kit<sup>+</sup>.

Um zu überprüfen, auf welchem Weg die adulten Knochenmarksstammzellen in das Herz migrieren, fertigten wir zunächst eine Real-Time PCR-Untersuchung auf die gängigsten myokardialen Homingfaktoren an. In diesem Screening zeigte sich, dass der korrespondierende Partner von VLA-4, das VCAM-1, der einzige erhöhte Faktor war. Um diesen Befund zu verifizieren, ermittelten wir die Expression von VCAM-1 weiterhin auf der Proteinebene mittels ELISA und in der Immunhistologie. In beiden Untersuchungen fanden wir das VCAM-1 signifikant erhöht im Vergleich zu den gesunden Kontrollen. Somit sprechen die Ergebnisse in ihrer Zusammenschau

für das Stattfinden von körpereigenen Reparaturvorgängen bei der DCMi.

Im zweiten Teil der Arbeit widmeten wir uns der Aufgabe die bestehenden körpereigenen Ansätze mit Hilfe einer Stimulation durch G-CSF zu verbessern. Die Behandlung mit G-CSF steigerte die im ersten Teil der Arbeit dargestellten Effekte noch weiter. Weiterhin konnten wir nach einer Therapie mit G-CSF bei den kranken Mäusen eine Verbesserung im histopathologischen Befund der Herzen und damit einhergehend eine Verringerung apoptotischer Kardiomyozyten nachweisen. Insgesamt resultierten die gezeigten Einzelbefunde in einer gesteigerten Herzarbeit der mit G-CSF behandelten Tiere. Somit kann die Gabe von G-CSF eine mögliche neue Therapieform zur Verbesserung des Herzfehlers bei virus-induzierter DCM darstellen.

## **6. Literaturverzeichnis**

1. Engelmann, M. and F. WM, *Stem cell therapy after myocardial infarction: ready for clinical application?* Curr Opin Mol Ther, 2006(8(5)): p. 396-414.
2. Theiss, H., et al., Der Bay. Int., 2007( 27 ): p. 87-91.
3. Theiss, H., et al., *Circulation of CD34+ progenitor cell populations in patients with idiopathic dilated and ischaemic cardiomyopathy (DCM and ICM).* Eur Heart J, 2007 (28(10)): p. 1258-64.
4. Strauer, B., et al., *Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans.* Circulation, 2002(106(15)): p. 1913-8.
5. Fruehauf, S. and S. T, *New strategies for mobilization of hematopoietic stem cells.* Future Oncol, 2005(1(3)): p. 375-83.
6. Rinck, P., *Magnetic Resonance in Medicine. The Basic Textbook of the European Magnetic Resonance Forum (EMRF).* ABW Wissenschaftsverlag GmbH 2003.
7. Vectastain, *WHAT IS THE ABC METHOD?*
8. Wikipedia, *Enzym linked Imunosorbent assay.*
9. Brunner, S., et al., *Enhanced stem cell homing mediated by VCAM-1/VLA-4 interaction improves cardiac function in virus-induced dilated cardiomyopathy* European Heart Journal (in Revision).
10. Statistisches Bundesamt, *Pressemitteilung Nr.344 vom 15.09.2009.* 2009.
11. Ince, H., et al., *Preservation from left ventricular remodeling by front-integrated revascularization and stem cell liberation in evolving acute myocardial infarction by use of granulocyte-colony-stimulating factor (FIRSTLINE-AMI).* Circulation, 2005. **112**(20): p. 3097-106.
12. Statistisches Bundesamt, [www.gbe-bund.de](http://www.gbe-bund.de). 2009.
13. Statistisches Bundesamt, *Pressemitteilung Nr.095 vom 06.03.2008.* 2008.
14. Neumann, T., et al., *Heart Failure: the Commonest Reason for Hospitalization in Germany- Medical and Economic Perspectives.* Dtsch Arztebl Int, 2009(106(16)): p. 269-75.
15. Herold, *Innere Medizin.* 2009.
16. Gerok, W., *Innere Medizin.* Schattauerverlag, 2006.
17. Organtransplantation, D.S., [www.dso.de](http://www.dso.de). 2009.

## 6. Literaturverzeichnis

18. WHO, *Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies*. Br Heart J, 1980(44 (6)): p. 672-3.
19. Richardson, P., et al., *Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies*. Circulation, 1996(93 (5)): p. 841-2.
20. Stevens, P. and K. Ground, *Occurrence and significance of myocarditis in trauma*. Aerosp Med, 1970(41): p. 776-80.
21. Maron, B., et al., *Sudden deaths in young competitive athletes: analysis of 1866 deaths in the United States, 1980-2006*. Circulation 2009(119): p. 1085-92.
22. Mason, J., *Myocarditis and dilated cardiomyopathy: an inflammatory link*. Cardiovasc Res 2003(60): p. 5-10.
23. Kuhl, U., et al., *High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction*. Circulation, 2005(111): p. 887-93.
24. Bowles, N., et al., *Detection of coxsackie-B-virus-specific RNA sequences in myocardial biopsy samples from patients with myocarditis and dilated cardiomyopathy*. Lancet, 1986( 1): p. 1120-1123.
25. Martino, T., et al., *Enteroviral myocarditis and dilated cardiomyopathy: a review of clinical and experimental studies*. In: Rothbard HA, ed. *Human Enterovirus Infections*. American Society for Microbiology, Washington D.C., 1995: p. 291-350.
26. Böcker, Denk, and Heitz, *Pathologie*. Urban&Fischer 3.Auflage, 2004.
27. Huber, S., C. Gauntt, and P. Sakkinen, *Enteroviruses and myocarditis: viral pathogenesis through replication, cytokine induction, and immunopathogenicity*. Adv Virus Res, 1998(51): p. 35-80.
28. Klingel, K., et al., *Molecular pathology of inflammatory cardiomyopathy*. Med Microbiol Immunol 2004(193): p. 101-7.
29. Figulla, H., *Transformation of myocarditis and inflammatory cardiomyopathy to idiopathic dilated cardiomyopathy: facts and fiction*. Med Microbiol Immunol, 2004(193(2-3): p. 61-4.
30. Schultheiss, H., et al., *Cardiomyopathies. I: classification of cardiomyopathies--dilated cardiomyopathy*. Internist (Berl), 2005(Nov;46(11)): p. 1245-56.
31. Schultz, J., et al., *Diagnosis and treatment of viral myocarditis*. Mayo Clin Proc, 2009 (84(11)): p. 1001-9.

## 6. Literaturverzeichnis

32. Kühl, U. and H. Schultheiss, *Treatment of chronic myocarditis with corticosteroids*. Eur Heart J, 1995(Dec;16 Suppl O): p. 168-72.
33. Frustaci, A., et al., *Immunosuppressive therapy for active lymphocytic myocarditis: virological and immunologic profile of responders versus nonresponders.*, in *Circulation*. 2003. p. 857-63.
34. Frustaci, A., Russo MA, and C. C, *Randomized study on the efficacy of immunosuppressive therapy in patients with virus-negative inflammatory cardiomyopathy: the TIMIC study*. Eur Heart J, 2009 (30(16)): p. 1995-2002.
35. Kühl, U., et al., *Interferon-beta treatment eliminates cardiotropic viruses and improves left ventricular function in patients with myocardial persistence of viral genomes and left ventricular dysfunction*. Circulation, 2003(107(22)): p. 2793-8.
36. Kuhl, U., et al., *Viral persistence in the myocardium is associated with progressive cardiac dysfunction.* ; Circulation 2005(112:): p. 1965-70.
37. Theiss, H., W. Franz, and e. al, *From Bench to Bedside: Stammzelltherapie bei der Herzinsuffizienz* Med Klin 2006(101): p. 77-81.
38. Jackson, K., et al., *Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells*. J Clin Invest, 2001(107(11)): p. 1395-402.
39. Jansen, J., et al., *Transplantation of hematopoietic stem cells from the peripheral blood*. J Cell Mol Med, 2005. **9**(1): p. 37-50.
40. Asahara, T., et al., *Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis*. Science, 1997 (275(5302)): p. 964-7.
41. Urbich, C. and S. Dimmeler, *Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology*. Circ Res, 2004. **95**(4): p. 343-53.
42. Feuring-Buske, M. and D.E. Hogge, *Hoechst 33342 efflux identifies a subpopulation of cytogenetically normal CD34(+)CD38(-) progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia*. Blood, 2001. **97**(12): p. 3882-9.
43. Scharenberg, C.W., M.A. Harkey, and B. Torok-Storb, *The ABCG2 transporter is an efficient Hoechst 33342 efflux pump and is preferentially expressed by immature human hematopoietic progenitors*. Blood, 2002. **99**(2): p. 507-12.
44. Pittenger, M. and M. BJ, *Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics*. Circ Res, 2004 (95(1)): p. 9-20.
45. Reyes, M., et al., *Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow*. J Clin

## 6. Literaturverzeichnis

- Invest, 2002. **109**(3): p. 337-46.
46. Jiang, Y., et al., *Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain*. Exp Hematol, 2002 (30(8)): p. 896-904.
47. Kögler, G., et al., *A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential*. J Exp Med., 2004 (200(2)): p. 123-35.
48. Kucia, M., et al., *A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)SSEA-1(+)Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow*. Leukemia, 2006. **20**(5): p. 857-69.
49. Kucia, M., et al., *Identification of very small embryonic like (VSEL) stem cells in bone marrow*. Cell Tissue Res, 2008. **331**(1): p. 125-34.
50. Oh, H., et al., *Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003 (100(21)): p. 12313-8.
51. Laugwitz, K.L., et al., *Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages*. Nature, 2005. **433**(7026): p. 647-53.
52. Beltrami, A., et al., *Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration*. Cell 2003(114): p. 763-76.
53. Menasché, P., *Skeletal myoblast for cell therapy*. Coron Artery Dis, 2005(16(2)): p. 105-10.
54. Brunner, S., M. Engelmann, and W. Franz, *Stem cell mobilisation for myocardial repair*. Expert Opin Biol Ther 2008(8): p. 1675-90.
55. Kocher, A., et al., *Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function*. Nat Med 2001(7): p. 430-6.
56. Narula, J., et al., *Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure*. N Engl J Med, 1996(335(16)): p. 1182-9.
57. Tomita, S., et al., *Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation*. J Thorac Cardiovasc Surg, 2002 (123(6)): p. 1132-40.
58. Orlic, D., J. Hill, and A. Arai, *Stem cells for myocardial regeneration*. Circ Res, 2002 (91(12)): p. 1092-102.
59. Gneccchi, M., et al., *Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells*. Nat Med, 2005. **11**(4): p. 367-8.
60. Uemura, R., et al., *Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling*. Circ Res, 2006. **98**(11): p. 1414-21.



## 6. Literaturverzeichnis

61. Zhang, Z., et al., *Secreted frizzled related protein 2 protects cells from apoptosis by blocking the effect of canonical Wnt3a*. J Mol Cell Cardiol, 2009. **46**(3): p. 370-7.
62. Orlic, D., et al., *Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium*. Nature, 2001(410(6829)): p. 701-5.
63. Yeh, E., et al., *Transdifferentiation of human peripheral blood CD34<sup>+</sup>-enriched cell population into cardiomyocytes, endothelial cells, and smooth muscle cells in vivo*. Circulation, 2003(108(17)): p. 2070-3.
64. Nagaya, N., et al., *Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy*. Circulation, 2005 (112(8)): p. 1128-35.
65. Schuster, M., et al., *Myocardial neovascularization by bone marrow angioblasts results in cardiomyocyte regeneration*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004 (287(2)): p. H525-32.
66. Murry, C., et al., *Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts*. Nature, 2004(428(6983)): p. 664-8.
67. Agbulut, O., et al., *Comparison of human skeletal myoblasts and bone marrow-derived CD133<sup>+</sup> progenitors for the repair of infarcted myocardium*. J Am Coll Cardiol, 2004(44(2)): p. 458-63.
68. Zaruba, M. and W. Franz, *Role of the SDF-1-CXCR4 axis in stem cell-based therapies for ischemic cardiomyopathy*. Expert Opin Biol Ther, 2010(10): p. 321-35.
69. Askari, A., et al., *Effect of stromal-cell-derived factor 1 on stem-cell homing and tissue regeneration in ischaemic cardiomyopathy*. Lancet 2003(362): p. 697-703.
70. Fazel, S., et al., *Cardioprotective c-kit<sup>+</sup> cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines*. J Clin Invest, 2006 (116(7)): p. 1865-77.
71. Deindl, E., et al., *G-CSF administration after myocardial infarction (MI) in mice attenuates late ischemic cardiomyopathy by enhanced arteriogenesis*. Faseb J, 2006(20(7)): p. 956-8.
72. Brunner, S., et al., *G-CSF treatment after myocardial infarction: Impact on bone marrow-derived vs cardiac progenitor cells*. Exp Hematol 2008(36(6)): p. 695-702.
73. Wollert, K., et al., *Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial*. Lancet 2004(364(9429)): p. 141-8.
74. Perin, E., et al., *Transendocardial, autologous bone marrow cell transplantation for severe, chronic ischemic heart failure*. Circulation, 2003(107(18)): p. 2294-302.
75. Tokunaga, M., et al., *Implantation of Cardiac Progenitor Cells using Self-assembling*

## 6. Literaturverzeichnis

- Peptide Improves Cardiac Function after Myocardial Infarction*. J Mol Cell Cardiol, 2010 ([Epub ahead of print]).
76. Strauer, B., M. Brehm, and e. al, *Repair of infarcted myocardium by autologous intracoronary mononuclear bone marrow cell transplantation in humans*. Circulation, 2002(106(15)): p. 1913-8.
77. Assmus, B., et al., *Transcoronary transplantation of progenitor cells after myocardial infarction*. N Engl J Med 2006(355(12)): p. 1222-32.
78. Stamm, C., H. Kleine, and e. al, *CABG and bone marrow stem cell transplantation after myocardial infarction*. Thorac Cardiovasc Surg, 2004(52(3)): p. 152-8.
79. Boonbaichaiyapruk, S., et al., *Transcoronary infusion of bone marrow derived multipotent stem cells to preserve left ventricular geometry and function after myocardial infarction*. Clin Cardiol, 2010. **33**(7): p. E10-5.
80. Dai, W. and R.A. Kloner, *Experimental cell transplantation therapy in rat myocardial infarction model including nude rat preparation*. Methods Mol Biol, 2010. **660**: p. 99-109.
81. Flores-Ramirez, R., et al., *Intracoronary infusion of CD133+ endothelial progenitor cells improves heart function and quality of life in patients with chronic post-infarct heart insufficiency*. Cardiovasc Revasc Med, 2010. **11**(2): p. 72-8.
82. Guo, H., et al., *Transplantation of marrow-derived cardiac stem cells carried in fibrin improves cardiac function after myocardial infarction*. Tissue Eng Part A, 2010.
83. Karatasakis, G., et al., *Intracoronary infusion of selected autologous bone marrow stem cells improves longitudinal myocardial strain and strain rate in patients with old anterior myocardial infarction without recent revascularization*. Eur J Echocardiogr, 2010. **11**(5): p. 440-5.
84. Liao, S.Y., et al., *Pro-arrhythmic Risk of Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Transplantation in Infarcted Myocardium*. Heart Rhythm, 2010.
85. Tang, X.L., et al., *Intracoronary administration of cardiac progenitor cells alleviates left ventricular dysfunction in rats with a 30-day-old infarction*. Circulation, 2010. **121**(2): p. 293-305.
86. Menasche, P., A. Hagege, and e. al, *Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction*. J Am Coll Cardiol 2003(41(7)): p. 1078-83.
87. Kraitman, D., A. Heldman, and e. al, *In vivo magnetic resonance imaging of mesenchymal stem cells in myocardial infarction*. Circulation 2003(107(18)): p. 2290-3.

## 6. Literaturverzeichnis

88. Templin, C., D. Kotlarz, and e. al, *Transcoronary delivery of bone marrow cells to the infarcted murine myocardium: feasibility, cellular kinetics, and improvement in cardiac function*. Basic Res Cardiol, 2006(101(4)): p. 301-10.
89. Kovacic, J.C., et al., *Update on the use of stem cells for cardiac disease*. Intern Med J, 2005. **35**(6): p. 348-56.
90. Zhang, Y., et al., *Synergistic effects of granulocyte-colony stimulating factor and macrophage-colony stimulating factor on recovery of donor hematopoietic cells in allogeneic bone marrow transplantation*. Oncol Rep 2006(16(2)): p. 367-71.
91. Ostronoff, M., et al., *Pilot study of allogeneic G-CSF stimulated bone marrow transplantation: harvest, engraftment, and graft-versus-host disease*. Biol Blood Marrow Transplant, 2006(12(7)): p. 729-33.
92. Kovacic, J.C., D.W. Muller, and R.M. Graham, *Actions and therapeutic potential of G-CSF and GM-CSF in cardiovascular disease*. J Mol Cell Cardiol, 2007. **42**(1): p. 19-33.
93. Hill, C. and e. al, *The structure of granulocyte-colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. , 1993(90): p. 5167-5171.
94. Basu, S., A. Dunn, and A.W. A, *G-CSF: function and modes of action (Review)*. Int J Mol Med Klin, 2002(10(1)): p. 3-10.
95. Kawakami, M., et al., *Levels of serum granulocyte colonystimulating factor in patients with infections*. Blood 1990(76(10)): p. 1962-4.
96. Wojakowski, W., et al., *Mobilization of CD34/CXCR4+, CD34/CD117+, c-met+ stem cells, and mononuclear cells expressing early cardiac, muscle, and endothelial markers into peripheral blood in patients with acute myocardial infarction*. Circulation 2004(110(20)): p. 3213-20.
97. Leone, A.M., et al., *Endogenous G-CSF and CD34+ cell mobilization after acute myocardial infarction*. Int J Cardiol, 2006. **111**(2): p. 202-8.
98. Bussolino, F., et al., *Granulocyte- and granulocyte-macrophage-colony stimulating factors induce human endothelial cells to migrate and proliferate*. Nature, 1989. **337**(6206): p. 471-3.
99. McKinsty, W.J., et al., *Cytokine receptor expression on hematopoietic stem and progenitor cells*. Blood, 1997. **89**(1): p. 65-71.
100. Harada, M., et al., *G-CSF prevents cardiac remodeling after myocardial infarction by activating the Jak-Stat pathway in cardiomyocytes*. Nat Med 2005(11(3)): p. 305-11.

## 6. Literaturverzeichnis

101. Roberts, A., *G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all!* Growth Factors 2005(23(1)): p. 33-41.
102. Pelus, L., et al., *Peripheral blood stem cell mobilization. A role for CXC chemokines.* Crit Rev Oncol Hematol 2002(43(3)): p. 257-75.
103. Petit, I., et al., *G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4.* Nat Immunol, 2002. **3**(7): p. 687-94.
104. Semerad, C.L., et al., *G-CSF potently inhibits osteoblast activity and CXCL12 mRNA expression in the bone marrow.* Blood, 2005. **106**(9): p. 3020-7.
105. Dlubek, D., D. Drabczak-Skrzypek, and A. Lange, *Low CXCR4 membrane expression on CD34(+) cells characterizes cells mobilized to blood.* Bone Marrow Transplant, 2006. **37**(1): p. 19-23.
106. Kim, H.K., et al., *G-CSF down-regulation of CXCR4 expression identified as a mechanism for mobilization of myeloid cells.* Blood, 2006. **108**(3): p. 812-20.
107. Levesque, J.P., et al., *Characterization of hematopoietic progenitor mobilization in protease-deficient mice.* Blood, 2004. **104**(1): p. 65-72.
108. Papayannopoulou, T., *Current mechanistic scenarios in hematopoietic stem/progenitor cell mobilization.* Blood, 2004. **103**(5): p. 1580-5.
109. Heissig, B., et al., *Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand.* Cell Stem Cell, 2002(109(5)): p. 625-37.
110. Christopherson, K.W., 2nd, S. Cooper, and H.E. Broxmeyer, *Cell surface peptidase CD26/DPPIV mediates G-CSF mobilization of mouse progenitor cells.* Blood, 2003. **101**(12): p. 4680-6.
111. Christopherson, K.W., et al., *CD26 is essential for normal G-CSF-induced progenitor cell mobilization as determined by CD26<sup>-/-</sup> mice.* Exp Hematol, 2003. **31**(11): p. 1126-34.
112. Christopherson, K.W., 2nd, et al., *G-CSF- and GM-CSF-induced upregulation of CD26 peptidase downregulates the functional chemotactic response of CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> human cord blood hematopoietic cells.* Exp Hematol, 2006. **34**(8): p. 1060-8.
113. Zaruba, M., et al., *Synergy between CD26/DPP-IV inhibition and G-CSF improves cardiac function after acute myocardial infarction.* Cell Stem Cell 2009(4): p. 313-23.
114. Theiss, H., et al., *Safety and efficacy of SITagliptin plus GRanulocyte-colony-stimulating factor in patients suffering from Acute Myocardial Infarction (SITAGRAMI-Trial) - Rationale, design and first interim analysis.* Int J Cardiol., 2010(Article in Press, Corrected

## 6. Literaturverzeichnis

Proof).

115. Orlic, D., et al., *Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival.* . Proc Natl Acad Sci U S A 2001(98): p. 10344-9.
116. Kong, D., et al., *Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries.* Circulation, 2004(110(14)): p. 2039-46.
117. Iwanaga, K., et al., *Effects of G-CSF on cardiac remodeling after acute myocardial infarction in swine.* Biochem Biophys Res Commun 2004(325(4)): p. 1353-9.
118. Ohtsuka, M., et al., *Cytokine therapy prevents left ventricular remodeling and dysfunction after myocardial infarction through neovascularization.* Faseb J, 2004(18(7)): p. 851-3.
119. Minatoguchi, S., et al., *Acceleration of the healing process and myocardial regeneration may be important as a mechanism of improvement of cardiac function and remodeling by postinfarction granulocyte colony-stimulating factor treatment.* Circulation, 2004(109(21)): p. 2572-80.
120. Kuhlmann, M., et al., *G-CSF/SCF reduces inducible arrhythmias in the infarcted heart potentially via increased connexin43 expression and arteriogenesis.* J Exp Med 2006(203(1)): p. 87-97.
121. Kolossov, E., et al., *Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium.* J Exp Med, 2006(203(10)): p. 2315-27.
122. Ince, H., et al., *Preservation from left ventricular remodeling by front-integrated revascularization and stem cell liberation in evolving acute myocardial infarction by use of granulocyte-colony-stimulating factor (FIRSTLINEAMI).* Circulation, 2005(112(20)): p. 3097-106.
123. Ince, H., et al., *Prevention of left ventricular remodeling with granulocyte colony-stimulating factor after acute myocardial infarction: final 1-year results of the Front-Integrated Revascularization and Stem Cell Liberation in Evolving Acute Myocardial Infarction by Granulocyte Colony-Stimulating Factor (FIRSTLINE-AMI) Trial.* Circulation, 2005. **112**(9 Suppl): p. I73-80.
124. Kuethe, F., et al., *Treatment with granulocyte colony-stimulating factor for mobilization of bone marrow cells in patients with acute myocardial infarction.* Am Heart J, 2005. **150**(1): p. 115.
125. Ripa, R.S., et al., *Stem cell mobilization induced by subcutaneous granulocyte-colony*

## 6. Literaturverzeichnis

- stimulating factor to improve cardiac regeneration after acute ST-elevation myocardial infarction: result of the double-blind, randomized, placebo-controlled stem cells in myocardial infarction (STEMMI) trial.* Circulation, 2006. **113**(16): p. 1983-92.
126. Takano, H., et al., *Feasibility and safety of granulocyte colony-stimulating factor treatment in patients with acute myocardial infarction.* Int J Cardiol, 2007. **122**(1): p. 41-7.
127. Valgimigli, M., et al., *Use of granulocyte-colony stimulating factor during acute myocardial infarction to enhance bone marrow stem cell mobilization in humans: clinical and angiographic safety profile.* Eur Heart J, 2005. **26**(18): p. 1838-45.
128. Kang, H., et al., *Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte-colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial.* Lancet 2004(363(9411)): p. 751-6.
129. Kang, H., et al., *Differential effect of intracoronary infusion of mobilized peripheral blood stem cells by granulocyte colony-stimulating factor on left ventricular function and remodeling in patients with acute myocardial infarction versus old myocardial infarction: the MAGIC Cell-3-DES randomized, controlled trial.* Circulation 2006(114): p. 1145-51.
130. Kang, H.J., et al., *Intracoronary infusion of the mobilized peripheral blood stem cell by G-CSF is better than mobilization alone by G-CSF for improvement of cardiac function and remodeling: 2-year follow-up results of the Myocardial Regeneration and Angiogenesis in Myocardial Infarction with G-CSF and Intra-Coronary Stem Cell Infusion (MAGIC Cell) 1 trial.* Am Heart J, 2007. **153**(2): p. 237 e1-8.
131. Engelmann, M.G., et al., *Autologous bone marrow stem cell mobilization induced by granulocyte colony-stimulating factor after subacute ST-segment elevation myocardial infarction undergoing late revascularization: final results from the G-CSF-STEMI (Granulocyte Colony-Stimulating Factor ST-Segment Elevation Myocardial Infarction) trial.* J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(8): p. 1712-21.
132. Zohlnhofer, D., et al., *Stem cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor in patients with acute myocardial infarction: a randomized controlled trial.* Jama 2006(295(9)): p. 1003-10.
133. Ellis, S.G., et al., *Granulocyte colony stimulating factor in patients with large acute myocardial infarction: results of a pilot dose-escalation randomized trial.* Am Heart J, 2006. **152**(6): p. 1051 e9-14.

## 6. Literaturverzeichnis

134. Hou, X.W., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor reduces cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats*. Cardiovasc Drugs Ther, 2006. **20**(2): p. 85-91.
135. Hüttmann, A., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor. Induced blood stem cell mobilisation in patients with chronic heart failure*. Basic Res Cardiol 2006 (101): p. 78-86.
136. Bocchi, E.A., et al., *Granulocyte-colony stimulating factor or granulocyte-colony stimulating factor associated to stem cell intracoronary infusion effects in non ischemic refractory heart failure*. Int J Cardiol, 2010. **138**(1): p. 94-7.
137. Szalay, G., et al., *Ongoing coxsackievirus myocarditis is associated with increased formation and activity of myocardial immunoproteasomes*. Am J Pathol, 2006 (168(5)): p. 1542-52.
138. Kandolf, R. and H. PH, *Molecular cloning of the genome of a cardiotropic Coxsackie B3 virus: full-length reverse-transcribed recombinant cDNA generates infectious virus in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A 1985(82): p. 4818-22.
139. Klingel, K., et al., *Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992 (89(1)): p. 314-8.
140. Baan J, Jong TT, and e. al, *Continuous stroke volume and cardiac output from intra-ventricular dimensions obtained with impedance catheter*. Cardiovasc Res, 1981(15 (6)): p. 328-34.
141. Keithahn A, et al., *2103 Quantitative assessment of left ventricular function and volumes by cardiac MRI after application of G-CSF in postmyocarditic mice*. Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance, 2008(10): p. A372.
142. Eriksson, U., et al., *Lethal autoimmune myocarditis in interferon-gamma receptor-deficient mice: enhanced disease severity by impaired inducible nitric oxide synthase induction*. Circulation, 2001(103(1)): p. 18-21.
143. Ganten, D. and K. Ruckpaul, *Grundlagen der Molekularen Medizin*. Springer Verlag, 2008. **3.Auflage**: p. 29-30.
144. Wikipedia, *Caspasen*. 2009: p. <http://de.wikipedia.org/wiki/Caspasen>.
145. Wikipedia, *Caspase-3*. 2010: p. [http://en.wikipedia.org/wiki/Caspase\\_3](http://en.wikipedia.org/wiki/Caspase_3).
146. Seko, Y., et al., *Expression of vascular cell adhesion molecule-1 in murine hearts with acute myocarditis caused by coxsackievirus B3*. J Pathol 1996(180): p. 450-4.

## 6. Literaturverzeichnis

147. Devaux, B., et al., *Upregulation of cell adhesion molecules and the presence of low grade inflammation in human chronic heart failure*. Eur Heart J, 1997(18): p. 470-9.
148. Jin, H., et al., *A homing mechanism for bone marrow-derived progenitor cell recruitment to the neovasculature*. J Clin Invest, 2006(116): p. 652-62.
149. Messina, E., et al., *Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart*. Circ Res, 2004(95): p. 911-21.
150. Wollert, K. and D. H., *Clinical applications of stem cells for the heart*. Circ Res, 2005(96(2)): p. 151-63.
151. Janssens, S., et al., *Autologous bone marrow-derived stem-cell transfer in patients with ST-segment elevation myocardial infarction: double-blind, randomised controlled trial*. Lancet 2006(367(9505)): p. 113-21.
152. Britten, M., Assmus B, and Z. M, *Preserved Functional Improvement and Evidence for Reverse Left Ventricular Remodelling 2 Years after Intracoronary Progenitor Cell Therapy in Patients with Acute Myocardial Infarction*. American Heart Association, 2005(Scientific Sessions ): p. Abstract 2985.
153. Schachinger, V., et al., *Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction*. . N Engl J Med 2006(355): p. 1210-21.
154. Yang, J., Rayburn H, and H. RO, *Cell adhesion events mediated by alpha 4 integrins are essential in placental and cardiac development*. Development, 1995(121): p. 549-60.
155. Kwee, L., et al., *Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) deficient mice*. Development, 1995(121): p. 489-503.
156. Koch, A., et al., *Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1*. Nature, 1995(376): p. 517-9.
157. Papayannopoulou, T. and C. Craddock, *Homing and trafficking of hemopoietic progenitor cells*. Acta Haematol, 1997. **97**(1-2): p. 97-104.
158. Nakao, S., et al., *Synergistic effect of TNF-alpha in soluble VCAM-1-induced angiogenesis through alpha 4 integrins*. J Immunol, 2003. **170**(11): p. 5704-11.
159. Matsuura, K., et al., *Transplantation of cardiac progenitor cells ameliorates cardiac dysfunction after myocardial infarction in mice*. J Clin Invest, 2009(119): p. 2204-17.
160. Jansen, J., et al., *Transplantation of hematopoietic stem cells from the peripheral blood*. J Cell Mol Med, 2005(9): p. 37-50.



## 6. Literaturverzeichnis

161. Honold J, et al., *Effects of granulocyte colony stimulating factor on functional activities of endothelial progenitor cells in patients with chronic ischemic heart disease*. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 2006(26(10)): p. 2238-43.
162. Shimada, K., et al., *Therapy with granulocyte colony-stimulating factor in the chronic stage, but not in the acute stage, improves experimental autoimmune myocarditis in rats via nitric oxide*. J Mol Cell Cardiol.
163. Aicher, A., et al., *Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells*. Nat Med, 2003(9): p. 1370-6.
164. Lunde, K., et al., *Intracoronary injection of mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction*. N Engl J Med, 2006(355(12)): p. 1199-209.
165. Dill, T., et al., *Intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells improves left ventricular function in patients at risk for adverse remodeling after acute ST-segment elevation myocardial infarction: results of the Reinfusion of Enriched Progenitor cells And Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction study (REPAIR-AMI) cardiac magnetic resonance imaging substudy*. Am Heart J, 2009. **157**(3): p. 541-7.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

### **7. Abkürzungsverzeichnis**

BSA	Bovines Serumalbumin
BMC	Knochenmarksstammzellen
CD31/PECAM-1	Platelet endothelial cell adhesion molecule (Thrombozyten-Endothel-Zelladhäsionsmolekül)
CD34	Hämatopoetischer Stammzellmarker
CD45	Stammzellfaktor-Rezeptor
c-kit	Stammzellfaktor-Rezeptor
CM	Kardiomyopathie
CPC	Kardiale Progenitorzelle
CSC	Residente kardiale Stammzelle
CXCR4	Chemokin-Rezeptor 4, = Stromal cell-derived factor-1-Rezeptor
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DCMi	inflammatorische dilatative Kardiomyopathie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPP-IV/CD26	Dipeptidylpeptidase IV
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDV	Enddiastolisches Volumen
ESV	Endsystolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbant Assay (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
EPC	Endotheliale Progenitorzellen
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FGF	fibroblast growth factor
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSC	Forwardscatter (Vorwärtsstreulicht)
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
G-CSFR (= CD114)	G-CSF-Rezeptor
HE	Hämatoxylin-Eosin
HF	Herzfrequenz
HGF-1	Hepatozytenwachstumsfaktor-1
HIF-1	Hypoxia-induced Factor-1

## 7. Abkürzungsverzeichnis

HMV	Herzminutenvolumen
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
HZV	Herzzeitvolumen
ICM	Ischämische Kardiomyopathie
ICAM	Inter-Cellular Adhesions Molecule (zelluläres Adhäsionsmolekül)
IGF-1	Insulin-like growth factor - 1 (Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor - 1)
i.p.	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
KM	Knochenmark
LFA-1	Lymphozyten funktions-assoziierte Antigen-1
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVEDV	Linksventrikuläres enddiastolisches Volumen
MAPC	Multipotente adulte Progenitorzelle
MI	Myokardinfarkt
MNC	Mononukleäre Zellen
MRT	Magnetresonanz Tomographie
MSC	Mesenchymale Stammzelle
n	Anzahl
NaCl	Natrium-Chlorid-Lösung
p	Signifikanz
PB	Peripheres Blut
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Saline)
pfu	Plaque forming Units
p.i.	Post infectionem
PTCA	Perkutane transluminale koronare Angioplastie
qRT-PCR	Quantitative real time-polymerase chain reaction (quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RVU	Relative volume units (relative Volumeneinheiten)
Sca-1	Stammzellantigen-1
SCF	Stammzellfaktor

## 7. Abkürzungsverzeichnis

SDF-1	Stromal cell-derived factor 1 (Stromazell-abgeleiteter Faktor 1)
Sfrp2	Secreted frizzled related protein 2
SM	Skelettmyoblasten
SPECT	Einzel-Photon-Emissions-Computertomographie
SSC	Sidescatter (Seitwärtsstreulicht)
SV	Schlagvolumen
SW	Strokework (Schlagarbeit)
SZ	Stammzelle
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
USSC	Umbilikale somatische Stammzelle
VCAM-1	Vascular cell adhesions molecule-1 (Gefäßzellen Adhäsionsmolekül 1)
VEGF	Vascular endothelial growth factor (Gefäßendothel-Wachstumsfaktor)
VSEL-SC	Very small embryonic-like stem cell (sehr kleine embryonalähnliche Stammzelle)
VLA-4	Very late Antigen 4 (sehr spätes Antigen 4)
WHO	World health organisation (Weltgesundheitsorganisation)

## **8. Danksagung**

Zuerst bedanke ich mich vielmals bei Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang-Michael Franz für die Überlassung des Themas meiner Dissertation. Ebenso danke ich Ihm für sein in mich gesetztes Vertrauen, seine Führung, seinen steten Rat und seine Unterstützung. Durch Ihn und als Teil seiner Arbeitsgruppe konnte ich die Grundlagen wissenschaftlichen Denkens und Handelns kenn und schätzen lernen.

Besonderen Dank schulde ich weiterhin Herrn Dr. med. Stefan Brunner und Herrn PD Dr. med. Hans Theiss, die mich sehr gut betreut haben. Über den gesamten Zeitraum unterstützten und motivierten Sie mich und standen mir mit Rat und Tat sowohl im experimentellen Teil, als auch während den schriftlichen Arbeiten zur Seite.

Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Franz, die mich von Anfang an mit ihren Erfahrungen und praktischen und fachlichem Wissen angeleitet und unterstützt haben. Besonders möchte ich Frau J. Arcifa, Frau. R. Fischer und Herrn M. Vallaster für ihre Unterstützung bei der Durchführung einiger Versuche hervorheben.

Bei Frau PD Dr. med. Karin Klingel möchte ich mich für die sehr gute Kooperation im Bereich der Aufzucht und Infektion der Mäuse und für die schnelle Durchführung der Histologie und Immunhistologie danken. Ebenso bedanke ich mich bei Frau Dr. Alexandra Keithan für die Bereitstellung des Materials für das MRT und für die Hilfe bei der Durchführung der Aufnahmen im Rahmen der Kooperation mit der TU München.

Nicht zu Letzt danke ich meiner gesamten Familie für die Geduld, Unterstützung und Aufmunterungen ohne die das Medizinstudium und die Durchführung dieser experimentellen Arbeit niemals möglich gewesen wäre.

## 9. Lebenslauf

### **9. Lebenslauf**

#### **Persönliche Daten:**

Name: Monika Sibylle Gatti, geb. Leiß  
Geburtsdatum: 28.06.1979  
Geburtsort: München  
Familienstand: verheiratet

#### **Schulbildung:**

Sept.1985 - Juli 1989: Grundschule Eichenau  
Sept.1989 - Juli 1998: Graf-Rasso-Gymnasium Fürstenfeldbruck  
**Abschluss:** Allg. Hochschulreife (Note:1,8)

#### **Ausbildung:**

01.10.1998 – 31.10.2001: Ausbildung zur Krankenschwester  
**Abschluss:** staatliche Prüfung (Note: 1,0)  
**Auszeichnung:** Anerkennung der Regierung von Oberbayern für hervorragenden beruflichen Bildungsabschluss

#### **Beschäftigungen:**

01.11.2001 – 30.09.2002: Krankenschwester (Vollzeit) beim Klinikum Großhadern, Bereich Strahlentherapie/Orthopädie  
01.10.2002 – 31.12.2005: Weiterführung der Tätigkeit in Teilzeit (8,5Std/Woche)

#### **Studium:**

01.10.2002 – 30.04.2010: Studiengang Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU)  
**Physikum:** Ärztliche Vorprüfung am 09.09.2004 (Note: 2,33)  
**Staatsexamen:** 2. Staatsexamen am 30.04.2010 (Note 2,5)

#### **Ärztliche Tätigkeiten:**

01.12.2010 – 28.02.2011: Assistenzärztin der Inneren Medizin im Kreisklinikum Mindelheim  
01.03.2011 – aktuell: Assistenzärztin der Inneren Medizin Klinikum Memmingen, Medizinische Klinik I (Kardiologie, Pneumologie, Nephrologie)

## 9. Lebenslauf

### **Veröffentlichung:**

„Enhanced stem cell homing mediated by VCAM-1/VLA-4 interaction improves cardiac function in virus-induced dilated cardiomyopathy“ (European Heart Journal, in Revision)

Stefan Brunner, Hans Theiss, **Monika Leiss**, Bruno Huber, Rebekka Fischer, Alexandra Keithahn, Markus Vallaster, Rene Botnar, Markus Schwaiger, Martina Sauter, Reinhard Kandolf, Karin Klingel, Wolfgang-Michael Franz